



รายงานการวิจัย

การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Hapalosiphon*
โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

Photobiological hydrogen production from cyanobacteria genus
Hapalosiphon biomass using three-step microbial hydrogen-
producing system

สมรักษ์ รอดเจริญ Somrak Rodjaroen

ชุตินุช สุจจริต Chutinut Sujarit

เอนก สาวะอินทร์ Aneak Sawain

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2556

การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Hapalosiphon* โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตชีวมวลจากสาหร่าย การผลิตกรดอินทรีย์โดยกระบวนการหมักด้วยแอนแอโรบิกแบคทีเรียจากชีวมวลสาหร่ายและการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Hapalosiphon welwitschii* TISTR 8237 สามารถผลิตชีวมวล (0.45 ± 0.04 g (DW)/l) และสะสมแป้ง ($23.39 \pm 1.23\%$) สูงสุด โดยเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ภายใต้สภาวะ pH 7, 0.04 g/l K_2HPO_3 , 1.5 g/l $NaNO_3$ ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโปรตอนตารางเมตรต่อวินาที และเขย่า 150 รอบต่อนาที ระยะเวลา 21 วัน ชีวมวลถูกทำให้เข้มข้นจากนั้นนำไปหมักด้วยแอนแอโรบิกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งชีวมวลเข้มข้นที่หมักด้วยแอนแอโรบิกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 สามารถผลิตกรดกรดแลคติกสูงสุด ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยผลิตกรดมาลิก กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดซิตริก เท่ากับ 447.82 ± 8.02 , 604.67 ± 20.48 , $1,189.14 \pm 37.37$ and $3,241 \pm 136.72$ mM ตามลำดับ นำ supernatant ไปเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง 2 ชนิด ผลการทดลองพบว่า *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอัตรา 12.45 ± 0.41 ml/U/h

คำสำคัญ : ชีวมวล, การบำบัดน้ำเสีย, สาหร่ายขนาดเล็ก

Photobiological hydrogen production from cyanobacteria genus *Hapalosiphon* sp.
biomass using three-step microbial hydrogen-producing system

Abstract

The aims of the current study are to investigate the biomass production by algae, starch fermentation by anaerobic bacterial strains and hydrogen production by photosynthetic bacterial strains. The cyanobacterial strain, *Hapalosiphon welwitschii* TISTR 8237 showed the best results for biomass production of 0.45 ± 0.04 g (DW)/l with starch accumulation up to $23.39 \pm 1.23\%$ during photosynthetic growth in BG-11 media at pH 7, 0.04 g/l K_2HPO_3 , 1.5 g/l $NaNO_3$ and $28 \pm 1^\circ C$ under illumination at $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ on orbital shaker for 21 days. The algal biomass was concentrated and then converted into organic acids by anaerobic fermentation with 2 anaerobic bacterial strains. The concentrated algal biomass was hydrolyzed to 447.82 ± 8.02 , 604.67 ± 20.48 , $1,189.14 \pm 37.37$ and $3,241 \pm 136.72$ mM of malic acid, lactic acid, acetic acid and citric acid, respectively by *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 which gave the highest acetic acid production in 48 h. Two strains of photosynthetic bacteria were used in this study with the supernatant as carbon source. The photosynthetic bacterial strain, *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 yielded the highest hydrogen production rate of 12.45 ± 0.41 mL/h.

Keywords: Biomass, wastewater treatment, microalgae

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2556 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาตรีสาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและเป็นผู้ช่วยในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สุดท้ายขอกราบขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา

สมรักษ์ รอดเจริญและคณะ



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญ	5
บทนำ	6
ตรวจเอกสาร	8
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	22
สรุป	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	41



บทนำ

สถานการณ์ของโลกในปัจจุบัน แหล่งพลังงานต่างๆกำลังจะใกล้ถึงจุดวิกฤติ โดยแหล่งพลังงานที่ใช้ได้มาจาก น้ำมัน แก๊สธรรมชาติและถ่านหินถึงร้อยละ 95 และอีกร้อยละ 2 มาจากพลังงานนิวเคลียร์ ส่วนที่เหลือร้อยละ 3 นำมาจากแหล่งพลังงานอื่น (สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ, 2542) แหล่งพลังงานจากธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักเหล่านี้กำลังลดลงจนอาจจะไม่เพียงพอกับความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มสูงขึ้นในอนาคต จึงมีความพยายามหาวิธีการใหม่และแหล่งพลังงานอื่นมาทดแทน เช่น การผลิตไบโอดีเซลใช้กับเครื่องยนต์แทนน้ำมัน การวิจัยเพื่อหาพลังงานจากแหล่งอื่นจึงได้รับความสนใจและมีการส่งเสริมให้นักวิจัยคิดค้น และศึกษาวิธีการใหม่ที่จะผลิตพลังงานรวมถึงการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการทางชีวภาพ (Asada and Miyake, 1999) แก๊สไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ปลอดภัยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้กับเครื่องยนต์ทำให้ปราศจากมลพิษ ให้ความร้อนภายในอาคารบ้านเรือน รวมทั้งเชื้อเพลิงในเครื่องบิน (สบสุข, 2544) การเกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Green house effect) ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในอากาศที่เกิดจากการเผาไหม้ของน้ำมัน (Fossil fuel) แต่การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีที่สามารถผลิตพลังงานอย่างมีประสิทธิภาพและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การเกิดแก๊สไฮโดรเจนจะใช้พลังงานพื้นฐานจากแสงอาทิตย์และไม่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในกระบวนการเผาไหม้ (Asada and Miyake, 1999)

การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพ Gaffon (1939) ได้รายงานเป็นครั้งแรกไว้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาพที่มีแสงหลังจากเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic และไม่มีแสง จากนั้นเริ่มมีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายเรื่อยมา ซึ่งนอกจากสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) แล้ว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta) และแบคทีเรีย (Bacteria) พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ด้วย (Gaffon and Rubin, 1942; Ike *et al.*, 1999; Masukawa *et al.*, 2002) โดยสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนในปริมาณมาก และอยู่ช่วงพัฒนาในเชิงพาณิชย์ (Amos, 2003)

จากการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการรายงานชนิดสาหร่ายสายพันธุ์ในต่างประเทศ และเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธี direct photobiological hydrogen production โดยวิธีดังกล่าวพบว่าสาหร่ายยังคงผลิต O_2 และ H_2 ซึ่ง O_2 มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase หรือ nitrogenase ในสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายเขียวแกมน้ำเงิน ตามลำดับ โดยเอนไซม์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงนำมาสู่การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system (Ike *et al.*, 1997; Kawaguchi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006 and Rodjaroen, 2010) ในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่ม *Hapalosiphon* sp. ที่พบในประเทศไทยที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ จากนั้นคัดเลือกชนิดของสาหร่ายที่สามารถผลิตปริมาณไฮโดรเจนได้

ดีที่สุด นำมาศึกษาปัจจัยทางด้านกายภาพและด้านเคมีที่เหมาะสมของสาหร่ายชนิดนั้น ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้นำไปพัฒนาวิจัยการผลิตไฮโดรเจนให้ได้ในปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ที่สามารถผลิตแ่งสูง
- 2) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การผลิตชีวมวลและการผลิตแ่งของสาหร่าย *Hapalosiphon* sp.
- 3) ศึกษาการผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ด้วย anaerobic bacteria
- 4) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system



ตรวจเอกสาร

1. ไฮโดรเจน (Hydrogen)

1.1 บทนำ

แก๊สไฮโดรเจนเป็นแก๊สที่เล็กที่สุดและเบาที่สุดด้วยเหตุนี้ไฮโดรเจนจึงเป็นธาตุที่มีมากที่สุดในจักรวาล เป็นธาตุที่พบในธรรมชาติในรูปของสารประกอบต่างๆ เช่น แก๊สธรรมชาติ เมทานอล ถ่านหิน ชีวมวล และน้ำ โมเลกุลของไฮโดรเจนรวมกับโมเลกุลของออกซิเจน จะเกิดโมเลกุลใหม่คือโมเลกุลของน้ำ ซึ่งมีไฮโดรเจนอยู่ 2 อะตอมกับออกซิเจน 1 อะตอม โมเลกุลของน้ำก็สามารถแยกกลับมาเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนได้ (สبسซุช, 2544)

1.2 การแยกไฮโดรเจน

แก๊สไฮโดรเจนจะถูกผลิตขึ้นโดยหลักการแยกธาตุของน้ำ หรือ การสกัดจากแก๊สธรรมชาติ โดยผ่านกระบวนการไอน้ำ ตลาดการค้าหลักสำหรับแก๊สไฮโดรเจนคือปิโตรเคมี และอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ย องค์การนาซา (The National Aeronautics and Space Administration, NASA) ได้นำแก๊สไฮโดรเจนมาใช้ในกระสวยอวกาศ โดยเซลล์เชื้อเพลิงจะรวมก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจน เกิดเป็นน้ำและให้กระแสไฟฟ้าสำหรับลูกเรือในอวกาศใช้ดื่มกิน (สبسซุช, 2544)

วิธีการแยกแก๊สไฮโดรเจน

1. Thermochemical processes ใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพให้กลายเป็นแก๊สผสมที่สามารถที่จะผลิต hydrogen ได้
2. Photobiological processes ใช้แสงแดดและกระบวนการทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย ในการแยกน้ำให้กลายเป็น hydrogen และ oxygen
3. Photoelectrochemical processes ใช้เทคโนโลยีของ semiconductor เพื่อที่จะแยกน้ำโดยใช้แสงแดด เช่น ใช้ไฟฟ้าจาก solar cell เป็นต้น (กิตติศักดิ์, 2544)

2. การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายขนาดเล็ก และสาหร่ายสีน้ำเงิน (Biophotolysis of water by microalgae and cyanobacteria)

การผลิตไฮโดรเจนสามารถทำได้จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Photoautotrophic หรือ Photoheterotrophic (Akkerman *et al.*, 2002) ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวกวมน้ำเงิน และแบคทีเรียบางชนิด (Asada and Miyake, 1999) ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็ก สาหร่ายสีเขียวกวมน้ำเงิน และพืชชั้นสูงได้ตั้งสมการนี้ (Miyomoto, 1997)



กระบวนการสังเคราะห์แสง 2 แบบ คือ กระบวนการสังเคราะห์แสงในสภาพที่มีออกซิเจน (Oxygenic photosynthesis) และในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Anoxygenic photosynthesis) (Asada and

Miyake, 1999) โดยมีเอนไซม์ 2 ชนิดที่เป็นตัวเร่งให้เกิดการผลิตไฮโดรเจน คือ เอนไซม์ Hydrogenase และ เอนไซม์ Nitrogenase

Miyamoto (1994) กล่าวว่า มีเอนไซม์ 3 ชนิดที่เป็นตัวเร่งให้เกิดโมเลกุลของไฮโดรเจน ดัง
สมการ



เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ “uptake” hydrogenase, “reversible” hydrogenase และ nitrogenase โดย nitrogenase ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) (ตารางที่ 1) เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้อาจพบได้ใน จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้

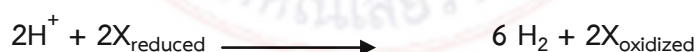
ตารางที่ 1 เอนไซม์ที่สามารถเมแทบอลิซึมโมเลกุลของไฮโดรเจน

Hydrogenase	Type of H ₂ metabolism		Inhibitor	Function
	Evolution	Uptake		
Reversible	+	+	CO, O ₂	Fermentation
Uptake	-	+	CO, C ₂ H ₂	H ₂ -recycling
Nitrogenase	+	-	N ₂ , C ₂ H ₂ , O ₂	(N ₂ -fixation)

2.1 เอนไซม์ Hydrogenase เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย

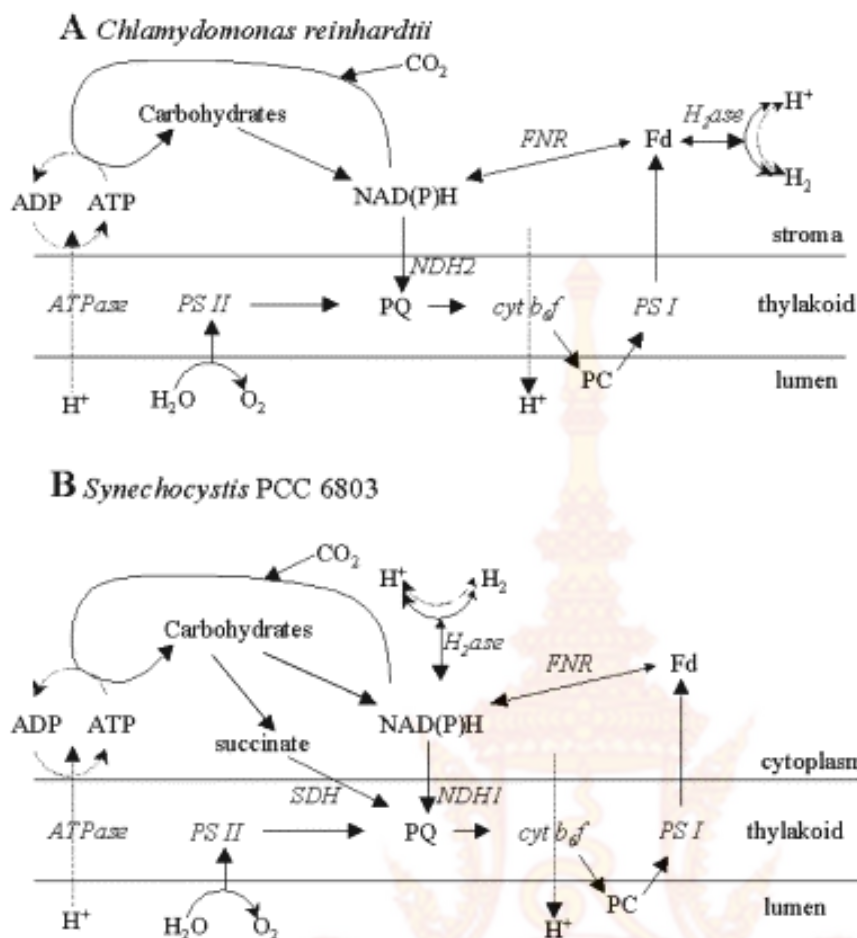
Gaffon and Rubin (1942) พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาพที่มีแสงหลังจากเลี้ยงในสภาวะ anaerobic และไม่มีแสง

กระบวนการเกิดเอนไซม์ Hydrogenase เมื่อนำสาหร่ายไปเลี้ยงในสภาวะ Anaerobic สาหร่ายก็สามารถผลิตเอนไซม์ Hydrogenase ออกมา ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นต้นเหตุทำให้เกิดไฮโดรเจนและมีหน้าที่รวมโปรตอนและอิเล็กตรอนเกิดเป็นแก๊สไฮโดรเจน (Yildiz et al, 1994; Mertens and Liese. 2004.) โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังสมการ



อิเล็กตรอนเป็นตัวนำ X ผ่าน Ferredoxin โดยที่ Ferredoxin รับอิเล็กตรอนจากน้ำในกระบวนการ Photochemical reaction โดยหลักการแตกตัวของน้ำในสาหร่ายสีเขียว

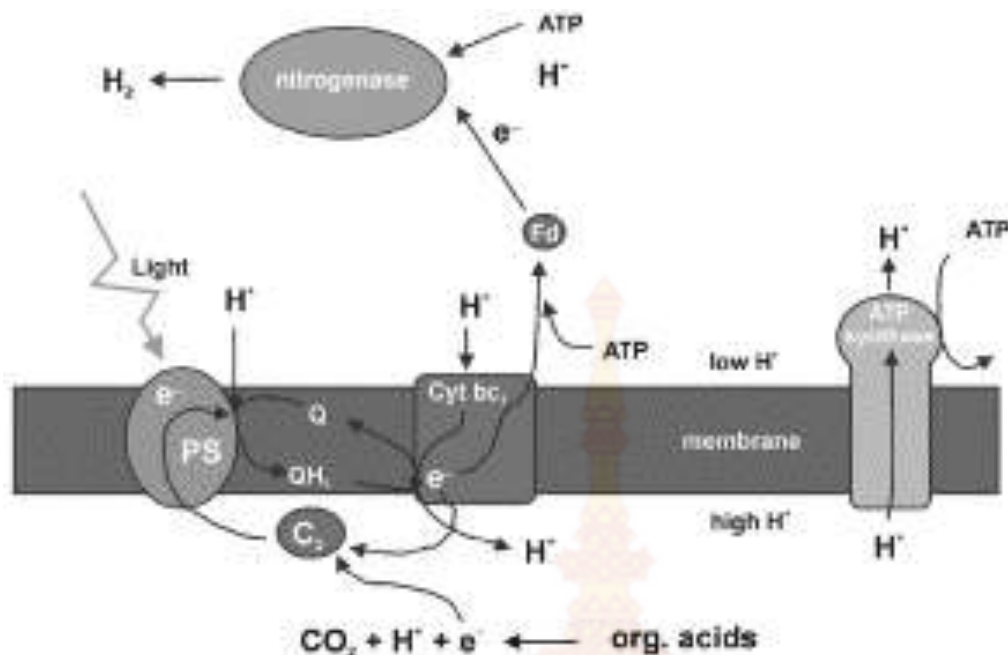
กลไกการทำงานของเอนไซม์ Hydrogenase เพื่อสร้างไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Synechocystis* แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการเกิดไฮโดรเจนในสาหร่าย A) *Chlamydomonas reinhardtii*
B) *Synechocystis* PCC 6803

2.2 เอนไซม์ Nitrogenase เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรีย

Benemann and Weare (1974) พบว่า สาหร่ายกลุ่มสีน้ำเงินแกมเขียว *Anabaena cylindrica* สามารถผลิตทั้งแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สออกซิเจนสู่บรรยากาศเป็นเวลาหลายชั่วโมง โดยเอนไซม์ Nitrogenase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน และพบในกลุ่มโปรคาริโอต รวมทั้ง Cyanobacteria แต่จะไม่พบในกลุ่มยูคาริโอต ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กระบวนการเกิดไฮโดรเจนในแบคทีเรีย (Akkerman *et al.*, 2002)

3. วัฏจักรการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย

Tsygankov *et al.* (2002) พบว่า กลไกทางสรีระของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* หลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซัลเฟอร์ ก่อนจะผลิตไฮโดรเจนออกมา แบ่งได้ 5 ระยะ

1. Aerobic phase เป็นช่วงแรก สาหร่ายเริ่มมีการสังเคราะห์แสง แล้วปล่อยออกซิเจนออกมา (O_2 evolution)
2. O_2 consumption phase เป็นระยะที่มีการสังเคราะห์แสงแล้วปล่อยออกซิเจนออกมามากกว่าการหายใจ (Respiratory activity) ในเซลล์สาหร่าย
3. Anaerobic phase เป็นระยะที่ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกดึงออกหมดจากกระบวนการหายใจ
4. H_2 -production phase หลังจากสาหร่ายอยู่ในสภาพ Anaerobic ก็จะผลิตเอนไซม์ Hydrogenase
5. Termination phase เป็นระยะสุดท้ายสาหร่ายก่อนที่สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนออกมา

4. การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายโดยวิธี direct photobiological hydrogen production

รายงานครั้งแรกในการผลิตไฮโดรเจนพบสาหร่ายสีเขียว ในปี ค.ศ. 1942 โดย Gaffon and Robin พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ในที่เลี้ยงในสภาวะ Anaerobic สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ทั้งสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง นอกจากนี้ยังพบในสาหร่ายชนิดอื่นอีก ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายโดยวิธี direct photobiological hydrogen production

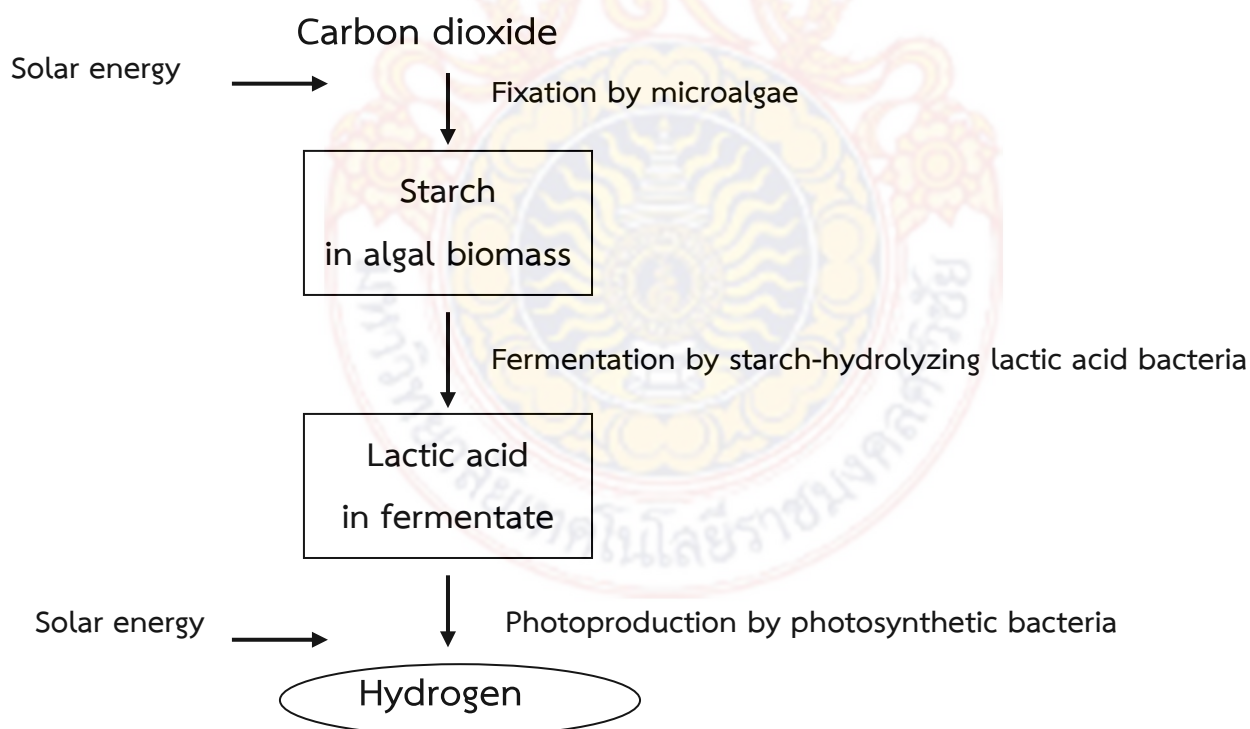
Species	light	H ₂	Condition	Reference
<i>Pleurosira laevis</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	1.5 $\mu\text{mol (gADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 17°C)	Three volatile halocarbons and different temperature	Abrahamssona, <i>et al.</i> , 2003
<i>Fucus vesiculosus</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	1.8 $\mu\text{mol (gADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 12°C)	Three volatile halocarbons and different temperature	Abrahamssona, <i>et al.</i> , 2003
<i>Platymonas subdiformis</i>	100 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mgh}^{-1}$	11,720 nl h^{-1}	Two-stage photobiological	Guan <i>et al.</i> , 2004
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Marine green algae) Green algae		10.0 $\mu\text{mol/mgChl/h}$ (light)	20-min assay	Miyamoto, 1994
<i>Cladophora glomerata</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	3.0, 2.8 $\mu\text{mol(g ADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 17, 23°C)	Three volatile halocarbon and different temperature	Abrahamssona <i>et al.</i> , 2003
<i>Enteromorpha ahlnneriana</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	22.0, 64.0 $\mu\text{mol(g ADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 17, 23°C)		Abrahamssona <i>et al.</i> , 2002
<i>Enteromorpha flexuosa</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.6 $\mu\text{mol(g ADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 23°C)		Abrahamssona <i>et al.</i> , 2002
<i>Enteromorpha interstitialis</i>	600 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	10.0, 26.0 $\mu\text{mol(g ADW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (H ₂ O ₂ ; t = 15, 17°C)		
	100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	2.0-2.8 $\text{ml h}^{-1} \text{ l}^{-1}$	Dilution sulfur-deprived	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	1.0 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mgch}^{-1}$	-	Laurinavichene <i>et al.</i> , 2002
<i>C. reinhardtii</i>	~300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	102 ml (after 140 h)	illumination, sulfur-deprived and	Cournac <i>et al.</i> , 2002
<i>C. reinhardtii</i>	-	1.8 $\mu\text{mol/mg Chl/h}$ (dake)	synchronized culture	Tsygankov <i>et al.</i> , 2002
<i>C. moewusii</i>	-		1-hr assay	Miyamoto, 1994
			6-hr assay	Miyamoto, 1994
<i>Chlorella fusca</i>			3-hr assay	
			3-hr assay, with dithionite	Miyamoto, 1994

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Species	light	H ₂	Condition	Reference
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5.1 μWcm^{-2}	0.4 $\mu\text{mol/mg Chl/h}$ (dark) 3.0 $\mu\text{mol/mg Chl/h}$ (light)		Akkerman <i>et al.</i> , 2002
<i>Scenedesmus</i> D3		8.4 $\mu\text{mol/mg Chl/h}$ (light) 126 nmol h^{-1}		
Blue green algae <i>Anabaena cylindrica</i>	-	30 mlh^{-1}	Nitrogen-starved culture	Weissman and Benemann, 1977
<i>Synechocystis</i> PCC6803	70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0.02 $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mgch}^{-1}$	-	Cournac <i>et al.</i> , 2002

5. การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายโดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายโดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system มีอยู่ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 คือ สาหร่ายตรึง CO₂ จากบรรยากาศ เพื่อการเจริญเติบโตและสะสมแป้งในเซลล์ ขั้นตอนที่ 2 ซิวมวลของสาหร่ายหมักด้วย anaerobic bacteria เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดมาลิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิติริก และกรดบิวทิริก ในขั้นตอนสุดท้าย นำกรดอินทรีย์ไปเลี้ยง photosynthetic bacteria เพื่อผลิตไฮโดรเจนดังภาพที่ 3 ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่ผ่านดังตารางที่ 3



ภาพที่ 3 การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

(Ike *et al.*, 1998)

ตารางที่ 3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายโดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

Microalgae	Lactic bacteria	Photosynthetic bacteria	H ₂ production ¹	References
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5	Ike et al. (1997)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. marinum</i>	8	Ike et al. (1997)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. sphaeroides</i>	4.6	Ike et al. (1998)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. marinum</i>	Not reported	Ike et al. (1998)
<i>D. tertiolecta</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. marinum</i>	6	Ike et al. (1998)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. marinum</i>	5.2	Kawaguchi et al. (2001)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>R. marinum</i>	5.2	Kawaguchi et al. (2001)
<i>D. tertiolecta</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>R. marinum</i>	6.1	Kawaguchi et al. (2001)
<i>D. tertiolecta</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>R. marinum</i>	5.2	Kawaguchi et al. (2001)
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Clostridium butyrium</i>	<i>R. sphaeroides</i>	8.3	Kim et al. (2006)
<i>Nostoc muscorum</i> TISTR 8871	<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> TISTR 868	<i>Rhodospseudomonas</i> sp. TISTR 1953	17.55±0.37 ²	Rodjaroen, (2010)

Note: ¹ mol H₂/mol of starch glucose, ² mL/V/h

6. การพัฒนา Bioreactor สำหรับผลิตไฮโดรเจนเพื่อการค้า

พลังงานจากไฮโดรเจนถือว่าเป็นพลังงานทดแทนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคต (Wunschiers and Lindblad, 2002) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสาหร่ายและแบคทีเรียหลายชนิดที่ผลิตไฮโดรเจนได้ จึงมีความพยายามผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมาก โดยมีการพัฒนา Bioreactor ที่เหมาะสมกับชนิดของสาหร่ายและค่าใช้จ่ายน้อย (Miyake et al., 1999) โดยสถาบัน National Renewable Energy Laboratory (NREL) ในสหรัฐอเมริกาสามารถพัฒนา Bioreactor ที่ผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ได้โดยมีค่าใช้จ่าย 0.57 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (ประมาณ 22.5 บาทต่อกิโลกรัม) (Amos, 2003) และมีรายงานของ Gartner (2004) ว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาตร 1 ลิตรต่อ 1 ชั่วโมง จากการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว 500 ลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

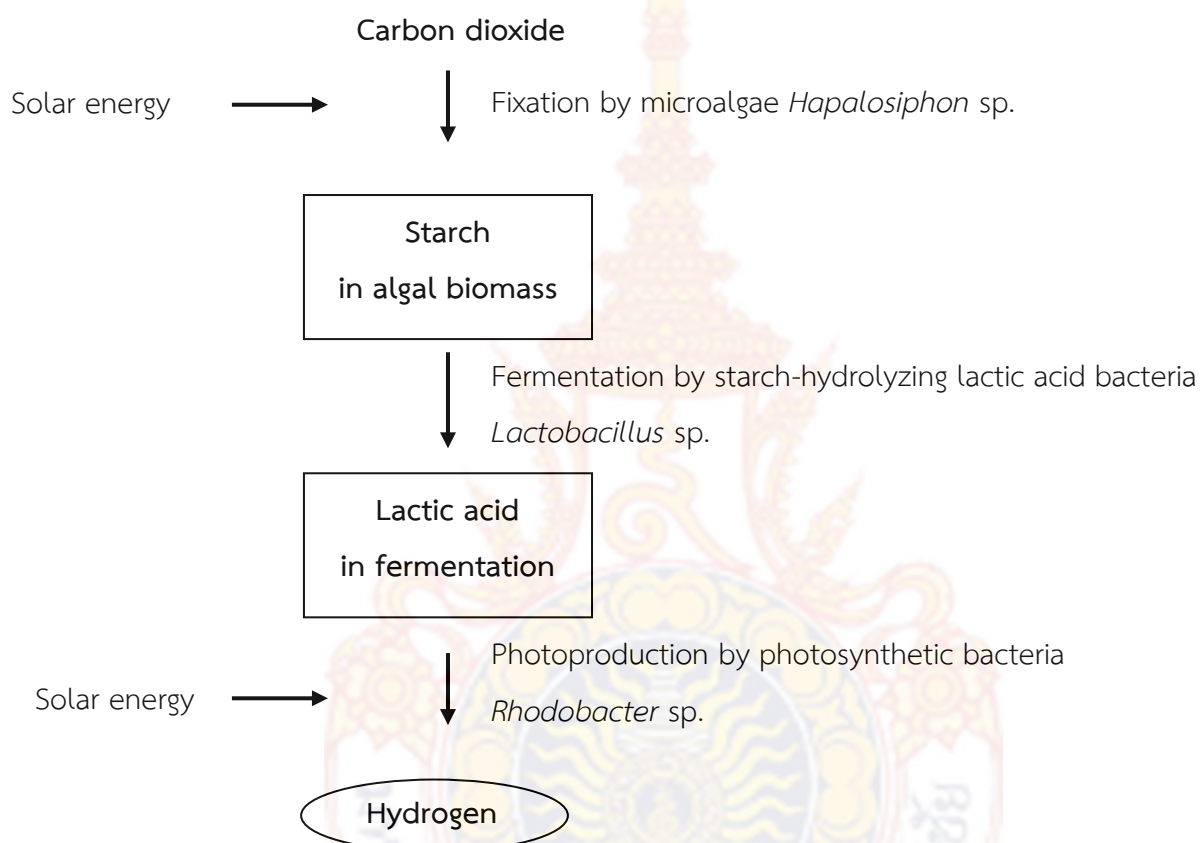
อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Light compound microscope)
2. เครื่องเขย่าเลี้ยงสาหร่าย (Orbital shaker)
3. ตู้อบ (Oven)
4. เครื่องชั่ง
5. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH meter)
7. เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO meter)
8. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)
10. UV-visible spectrophotometer
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
12. ตู้ถ่ายเชื้อ (Vertical laminar air flow)
13. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
14. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
15. ฝูงลากแพลงก์ตอน (Plankton net)
16. สารเคมีใช้วิเคราะห์คุณภาพน้ำ
17. เครื่องแก้วใช้วิเคราะห์คุณภาพน้ำ
18. ปั๊มสุญญากาศ (Suction pump)
19. โถดูดความชื้น (Desiccators)
20. Anaerobic jars
21. High performance liquid chromatography (HPLC)
22. Gas Chromatograph (GC)
23. Freezer Dryer
24. สายพันธุ์สาหร่ายและแบคทีเรีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

หลักการการวิจัยครั้งนี้

การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Hapalosiphon* sp. โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การผลิตไฮโดรเจน โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system
ที่มา: Ike et al. (1998a).

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Haplosiphon* sp. ที่สามารถผลิตแป้งสูง

การเลี้ยงสาหร่าย

นำตัวอย่างสาหร่ายสกุล *Haplosiphon* จำนวน 5 ชนิด คือ *H. delicatus* TISTR 8224 *H. fontinalis* TISTR 8225 *H. flagelliformis* TISTR 8234 *Haplosiphon* sp. TISTR 8236 และ *H. welwitschii* TISTR 8237 จากคลังสาหร่าย ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และสายพันธุ์สาหร่ายที่ได้จากการคัดแยกเองจากการเก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เลี้ยงในอาหาร BGA medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Laurinavichene *et al.*, 2002) ในขวดรูปชมพู่ปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสงประมาณ $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ช่วงแสงมืด:สว่าง เท่ากับ 12:12 ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา 20 วัน (Guan, *et al.*, 2004) โดยเลี้ยงบน shaker ที่ความเร็ว 150 rpm (Kim *et al.*, 2006; Kawaguchi *et al.*, 2001). ศึกษาการเจริญเติบโตและคัดเลือกสาหร่าย *Haplosiphon* sp. เพียงชนิดเดียว ที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ผลิตชีวมวลและผลิตแป้งสูง การวิเคราะห์แป้งโดย Kochart's method (1978)

2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตการผลิตชีวมวลและการผลิตแป้งของสาหร่าย *Haplosiphon* sp.

หลังจากได้สายพันธุ์ *Haplosiphon* sp. ที่ต้องการ นำเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับนำไปศึกษาหาปัจจัยทางเคมี ได้แก่ สูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของกลุ่มธาตุอาหารหลัก และปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ pH

2.1 การเตรียมเชื้อสาหร่ายเริ่มต้น

นำหัวเชื้อสาหร่ายจากหลอด Stock นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร BGA ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าเลี้ยงสาหร่าย ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ช่วงรับแสงมืด : สว่าง; 12 : 12 ชั่วโมง (Guan, *et al.*, 2004) ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ดัดแปลงมาจาก Kim *et al.*, 2006 และ Kawaguchi *et al.*, 2001 เมื่อได้ความหนาแน่นของเชื้อเพียงพอ นำเชื้อไปขยายต่อใน พลาสติก 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่สภาวะเหมือนเดิม จนได้ปริมาตรของเชื้อเพียงพอสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การเลี้ยงสาหร่าย

นำสาหร่ายมาเลี้ยงเพื่อสภาวะต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตชีวมวล เพื่อวัดการเจริญเติบโตโดยศึกษาปัจจัยและออกแบบการทดลอง ดังตารางที่ 4 โดยแต่ละระดับมี 3 ซ้ำ เลี้ยงในขวดพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่ $\text{OD}_{1000} = 0.5$ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ตามสภาวะเหมือนข้อ 14.2.1 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน (ระยะ Stationary phase) และเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน

ตารางที่ 4 ปัจจัยที่ศึกษาซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Hapalosiphon* sp.

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษา
สูตรอาหาร	BG-11, BGA, N8 และ Chu medium
ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน	-1, -0.5, สูตรปกติ, 0.5 และ 1 (เท่า)
ระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส	-1, -0.5, สูตรปกติ, 0.5 และ 1 (เท่า)
pH	5, 6, 7, สูตรปกติ, 8, 9 และ 10

2.3 การศึกษาชีวมวลสาหร่าย

2.3.1 การหาน้ำหนักเปียกสาหร่าย (Wet weight)

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายหลังสิ้นสุดการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง มากรองด้วยชุดกรองที่มีปั๊มอากาศช่วย ใช้กระดาษกรองชนิด Washman GF/C ขนาดรู 45 ไมครอน มาชั่งน้ำหนักสาหร่ายเปียก เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3.2 การหาน้ำหนักสาหร่ายแห้ง (Dry weight)

นำตัวอย่างสาหร่ายจากข้อ 2.3.1 มาหาน้ำหนักสาหร่ายแห้ง โดยนำสาหร่ายมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C (APHA, 1995)

2.4 การวิเคราะห์หาค่าการเจริญเติบโตสาหร่าย

2.4.1 การวิเคราะห์หา Growth curve

วัดความหนาแน่นเซลล์ด้วยการวัดค่า OD₁₀₀₀ (optimal density) ทุกๆ 2 วัน จำนวน 3 ซ้ำ จนค่า OD. ลดลง พร้อมทั้งปรับความเป็นกรดเป็นด่าง ทุกๆ 2 วัน โดยนำค่า OD. สาหร่ายที่ได้ นำมาวิเคราะห์หา Time courses of growth ของสาหร่าย ดัดแปลงตามวิธีของ Huang *et al.*, 2002 ดังสมการ

$$K = \frac{\log W_t - \log W_0}{T}$$

โดย W_t คือ OD. สุดท้ายในวันที่ของการวิเคราะห์ (Final fresh weight at t day)

W_0 คือ OD. เริ่มต้นในวันที่ของการวิเคราะห์ (Initial fresh weight)

t คือ จำนวนวันในการเลี้ยงสาหร่าย (Number of culture days)

บันทึกผลการทดลองและเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์

2.4.2 การวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่อวัน

สาหร่ายจะถูกเก็บทุก 2 วัน เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Daily growth rate; DGR=% day⁻¹) ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตรที่นำค่าจากระยะ Exponential growth จากการศึกษาที่ผ่านมา ดัดแปลงตามวิธีของ Dawes *et al.*, 1994

$$\text{DGR (\%)} = \ln (W_t/W_0)/t \times 100$$

โดย W_t คือ OD. สุดท้ายในวันที่ของการวิเคราะห์ (Final fresh weight at t day)

W_0 คือ OD. เริ่มต้นในวันที่ของการวิเคราะห์ (Initial fresh weight)

t คือ จำนวนวันในการเลี้ยงสาหร่าย (Number of culture days)

3. การผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ด้วย anaerobic bacteria

3.1 การหมักชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ด้วย anaerobic bacteria

เก็บเซลล์สาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ในระยะ Exponential growth โดยใช้ plankton net box มาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก นำชีวมวลของสาหร่ายที่ได้ทำให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่า (จากความเข้มข้นเดิม) จากนั้นผสมชีวมวลของสาหร่ายกับ anaerobic bacteria ในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวนสองสายพันธุ์ คือ *Lactobacillus amylovorus* และ *L. brevis subsp. brevis* จากคลังแบคทีเรีย ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยหมักใน anaerobic jars ในสภาพ anaerobic บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำแล้ววิเคราะห์หาปริมาณการผลิตกรดอินทรีย์

3.2 การเก็บกรดอินทรีย์

นำ fermentage หลังจากผ่านหมักชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ด้วย anaerobic bacteria มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge 10,000g เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน supernatant ออกจากกากสาหร่าย จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์

3.3 การวิเคราะห์กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่วิเคราะห์ คือ malic acid, lactic acid, acetic acid และ citric acid ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ Platinum EPS C₁₈ organic acid analysis column (250 mm X 4.6 mm, 5 μm) และใช้ 0.05 M KH₂PO₄ as mobile phase ที่ pH 2.4, photodiode array detector อัตราการไหล (flow rate) 1 mL/min (Rodjaroen, 2010)

4. ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

4.1 การผลิตไฮโดรเจน

นำกรดอินทรีย์ที่ได้มาเลี้ยงด้วย photosynthesis bacteria จำนวนสองสายพันธุ์ คือ *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodospseudomonas* sp. (จากคลังแบคทีเรีย ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ใน bioreactor ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในสภาพ anaerobic ที่อุณหภูมิ 40°C ให้แสง 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ด้วยหลอดไฟ halogen lamps (ดัดแปลงจาก Kim *et al.*, 2006)

4.2 การเก็บแก๊สไฮโดรเจน

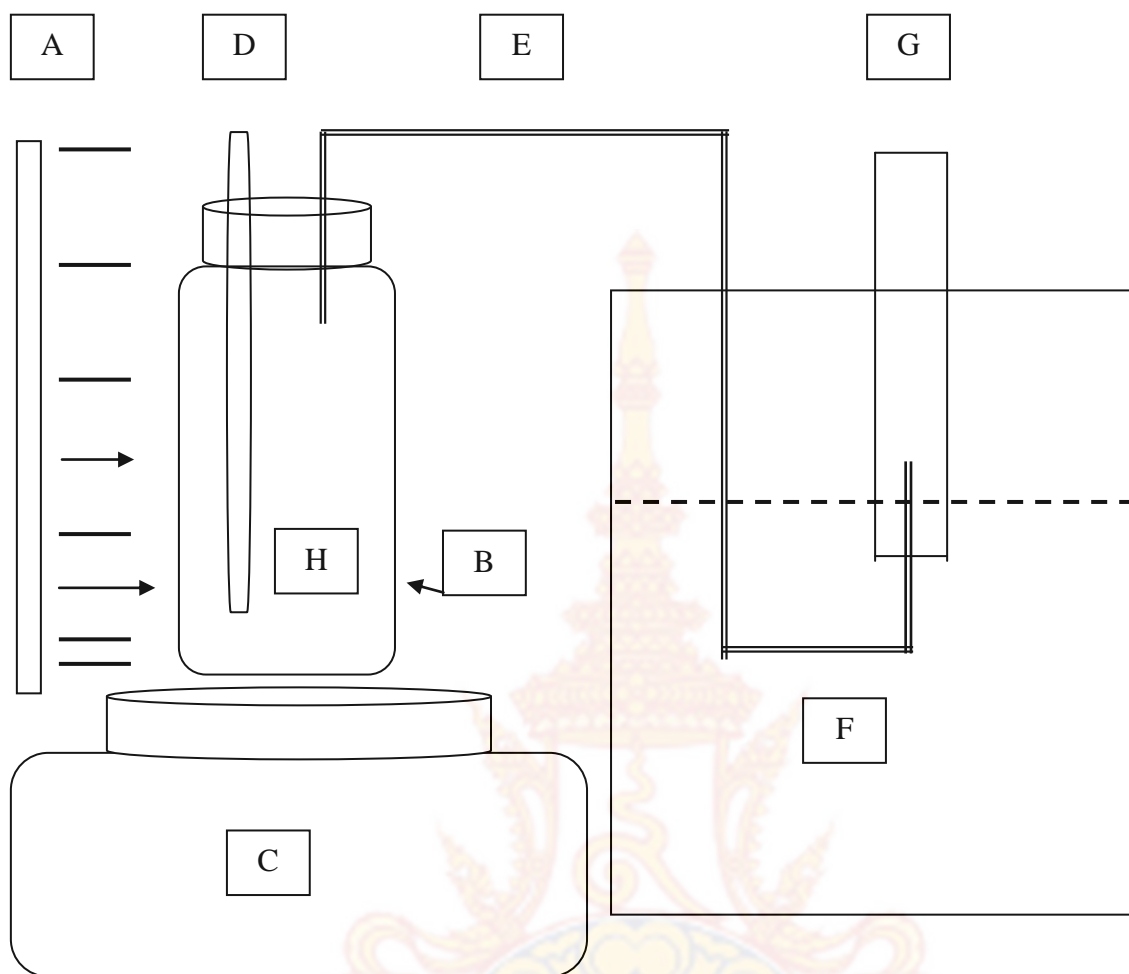
หลังจากเลี้ยง photosynthesis bacteria จะตรวจเช็คปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุก 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง photosynthesis bacteria หยุดการผลิต การวัดปริมาณการผลิตแก๊สไฮโดรเจนใช้หลักการแทนที่น้ำดังภาพที่ 5

4.3 การวิเคราะห์แก๊สไฮโดรเจน

วิเคราะห์ไฮโดรเจนด้วย Gas Chromatograph (GC) โดยใช้ molecular sieve Plot Q (30 m X 0.25 mm ID, 0.25 μm) column และใช้ Thermal Conductivity Detector (TCD) detector มีแก๊สอาร์กอน Ar as a carrier gas อัตราการไหล (flow rate) 1 ml/min (Rodjaroen, 2010)

5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ CRD โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วย Tukey's multiple comparison tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Zar, 1996) ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows version 12.0.



ภาพที่ 5 แบบจำลองการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธี a three-step microbial hydrogen-producing system.
 A) หลอดไฟ; B) the photo-bioreactor; C): the orbital shaker; D) หลอดเก็บตัวอย่าง; E) ท่อ
 ยาง; F) ตู้น้ำ; G) cylinder; และ H): the photosynthetic bacteria grown on supernatant.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ที่สามารถผลิตชีวมวลและผลิตแป้งสูง

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Hapalosiphon* จำนวน 5 ชนิด คือ *H. delicatus* TISTR 8224 *H. fontinalis* TISTR 8225 *H. flagelliformis* TISTR 8234 *Hapalosiphon* sp. TISTR 8236 และ *H. welwitschii* TISTR 8237 เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสงประมาณ $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ช่วงแสงมีด:สว่าง เท่ากับ 12:12 ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ โดยเลี้ยงบน shaker ที่ความเร็ว 150 rpm เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองพบว่า *H. welwitschii* TISTR 8237 ผลิตชีวมวลเพิ่มสูงสุดและมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกชนิด ($p < 0.05$) ในขณะที่ *H. delicatus* TISTR 8224 *H. fontinalis* TISTR 8225 *H. flagelliformis* TISTR 8234 และ *Hapalosiphon* sp. TISTR 8236 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

การสะสมแป้ง พบว่า *H. welwitschii* TISTR 8237 สามารถการสะสมแป้ง สูงสุดและมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกชนิด ($p < 0.05$) ในขณะที่ *H. delicatus* TISTR 8224 กับ *H. flagelliformis* TISTR 8234 และ *H. fontinalis* TISTR 8225 กับ *Hapalosiphon* sp. TISTR 8236 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 5 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ สาหร่าย *Hapalosiphon* จำนวน 5 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

Algal strains	Biomass production (g DW/l)	Starch accumulation (%)
<i>H. delicatus</i> TISTR 8224	0.19 ± 0.00^a	16.31 ± 0.38^a
<i>H. fontinalis</i> TISTR 8225	0.27 ± 0.00^a	19.84 ± 0.10^b
<i>H. flagelliformis</i> TISTR 8234	0.26 ± 0.07^a	15.30 ± 0.28^a
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8236	0.24 ± 0.03^a	19.01 ± 0.33^b
<i>H. welwitschii</i> TISTR 8237	0.49 ± 0.06^b	24.05 ± 0.29^c

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การผลิตชีวมวลและการผลิตแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237

2.1 ระยะเวลาในการเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *H. welwitschii* TISTR 8237 เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ระยะเวลา 7-35 วัน พบว่า การผลิตชีวมวลเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงสาหร่าย โดยมีค่าสูงสุดที่ 35 วัน (0.61 ± 0.11 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกระยะเวลาการเลี้ยง ($p < 0.05$) ยกเว้นที่ 21 และ 28 วัน ในขณะที่การสะสมแป้งพบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงสาหร่ายจนกระทั่งครบ 21 วัน จากนั้นการสะสมแป้งค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (26.25 ± 0.88 - 27.80 ± 1.34 เปอร์เซ็นต์) โดยที่ระยะการเลี้ยง 21-35 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 6 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ *H. welwitschii* TISTR 8237 เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ระยะเวลาต่างกัน

Day	Biomass production (g DW/l)	Starch accumulation (%)
7	0.31 ± 0.04^a	22.73 ± 1.74^a
14	0.40 ± 0.04^{ab}	23.65 ± 1.14^a
21	0.48 ± 0.01^b	26.25 ± 0.88^b
28	0.56 ± 0.12^b	27.80 ± 1.34^b
35	0.61 ± 0.11^b	27.77 ± 1.76^b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.2 สูตรอาหาร

การทดลองเลี้ยงสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ในอาหารแตกต่างกัน 4 สูตร เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่า การผลิตชีวมวลอยู่ในช่วง 0.29 ± 0.07 - 0.45 ± 0.04 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร โดยสาหร่ายสามารถผลิตชีวมวลสูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium (0.45 ± 0.04 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร) และมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกสูตรอาหาร ($p < 0.05$) ยกเว้นในสูตร Bold medium เช่นเดียวกันกับการสะสมแป้งพบว่า มีค่าสูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium (23.39 ± 1.23 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกสูตรอาหาร ($p < 0.05$) ยกเว้นในสูตร BGA medium (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 7 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างกัน เป็นระยะเวลา 21 วัน

Medium type	Biomass production (g DW/L)	Starch accumulation (%)
CHU medium	0.30±0.03 ^a	12.64±0.78 ^a
Bold medium	0.36±0.02 ^{ab}	16.87±1.97 ^{ab}
BGA medium	0.29±0.07 ^a	20.59±3.17 ^{bc}
BG-11 medium	0.45±0.04 ^b	23.39±1.23 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.3 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน

การผลิตชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ในอาหารสูตร BG-11 medium ที่เติมไนโตรเจน 5 ระดับ คือ 0.00, 0.75, 1.50, 3.00 และ 6.00 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสามารถผลิตชีวมวลได้สูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่เติมไนโตรเจน 1.5 กรัมต่อลิตร (0.51 ± 0.03 กรัม/น้ำหนักรีดแห้งต่อลิตร) รองลงมาคือ 3, 0.75, 6 และ สูตรที่ไม่เติมไนโตรเจน ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นที่ระดับ 0.75 และ 3.00 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม การสะสมแป้งพบว่า มีค่าสูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ไม่เติมไนโตรเจน (24.91 ± 1.14 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับที่เติมไนโตรเจน 1.5 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 8 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างกันของอาหารสูตร BG-11 medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

NaNO ₃ concentration (g/L)	Biomass production (g DW/L)	Starch accumulation (%)
0.00	0.25±0.11 ^a	25.13±1.72 ^b
0.75	0.35±0.02 ^{ab}	16.90±0.75 ^a
1.50	0.51±0.03 ^b	24.91±1.14 ^b
3.00	0.48±0.03 ^b	14.30±4.42 ^a
6.00	0.31±0.04 ^a	15.61±2.25 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.4 ระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส

การผลิตชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ในอาหารสูตร BG-11 medium ที่เติมฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.00, 0.02, 0.04, 0.08 และ 0.16 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 21 วัน ผล

การทดลองพบว่า สาหร่ายผลิตชีวมวลต่ำที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ไม่เติมฟอสฟอรัส และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกระดับความเข้มข้น แต่เมื่อเติมฟอสฟอรัสตั้งแต่ 0.02-0.16 กรัมต่อลิตร สาหร่ายสามารถผลิตชีวมวลได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.42 ± 0.02 - 0.47 ± 0.06 กรัม น้ำหนักแห้งต่อลิตร และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับการสะสมแป้งพบว่า มีค่าสูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่เติมฟอสฟอรัส 0.04 กรัมต่อลิตร (23.91 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 9 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่างกันของอาหารสูตร BG-11 medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O concentration (g/L)	Biomass production (g DW/L)	Starch accumulation (%)
0.00	0.31 ± 0.03^a	12.11 ± 1.62^a
0.02	0.42 ± 0.02^{ab}	19.01 ± 0.86^b
0.04	0.47 ± 0.03^b	23.91 ± 0.36^c
0.08	0.47 ± 0.06^b	16.40 ± 1.37^b
0.16	0.45 ± 0.07^b	14.13 ± 0.55^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.5 ระดับความเป็นกรดเบส

การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 เลี้ยงในอาหาร BG-11 medium ที่ระดับ pH 5 ระดับ คือ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสามารถผลิตชีวมวลและสะสมแป้งสูงสุดที่ระดับ pH 7 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.52 ± 0.05 กรัม น้ำหนักแห้งต่อลิตร และ 24.23 ± 0.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับทุกระดับ pH อย่างไรก็ตามการสะสมที่ pH 7, 8 และ 9 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ที่ระดับ pH 5 สาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 10 การผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งของ *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับความเป็นกรดเบสต่างกันของอาหารสูตร BG-11 medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

pH	Biomass production	Starch accumulation
	(g DW/l)	(%)
5	-	-
6	0.42±0.02 ^a	18.06±1.50 ^a
7	0.52±0.05 ^b	24.23±0.70 ^b
8	0.40±0.02 ^a	23.37±0.90 ^b
9	0.37±0.01 ^a	24.56±1.14 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเลี้ยงสาหร่ายการหาระยะเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการเก็บสาหร่ายเป็นปัจจัยสำคัญมาก เพราะจะช่วยลดต้นทุน เวลา และแรงงานในการผลิตสาหร่าย จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลา 21 วัน เหมาะสมสำหรับการเก็บเซลล์สาหร่ายชนิดนี้ เพราะถึงแม้เราจะเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงสาหร่าย แต่ผลการผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งก็ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Rodjaroen (2010) พบว่า สาหร่าย 29 ชนิด (สาหร่ายสีเขียว 14 ชนิด และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 15 ชนิด) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ 20 วัน เช่นเดียวกันกับสุพรรณษาและคณะ (2554) พบว่า *Nostoc* sp. TISTR 8290, *N. muscorum* TISTR 9054, *N. muscorum* TISTR 8871 and *Nostoc* sp. TISTR 8873 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ 21 วัน

สูตรอาหารจากการทดลองนี้พบว่า *H. welwitschii* TISTR 8237 สามารถผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งมีค่าสูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ เมื่อต้องประกอบสารอาหารในแต่ละสูตรพบว่า อาหารสูตร BG-11 medium มีปริมาณสารอาหารมากที่สุด สอดคล้องกับสมรักษ์และคณะ (2554) พบว่าสาหร่าย *N. muscorum* TISTR 8871 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium สามารถผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.38 ± 0.00 gDW/l และสะสมแป้งเท่ากับ 33.49 ± 0.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในสาหร่ายสกุล *Nostoc* ก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสูตรอาหาร BG-11 medium (สุพรรณษาและคณะ, 2554)

สำหรับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (limited factor) จากการทดลองนี้พบว่า ในสูตรอาหารสูตรที่ไม่เติมไนโตรเจนจะมีการสะสมแป้งสูง เนื่องจากสาหร่ายผลิตโพลีแซคคาไรด์ออกมามาก แต่การผลิตชีวมวลต่ำที่สุด ซึ่งเป็นการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของสาหร่ายในสภาพการขาดสารอาหาร (Rodjaroen, 2010) เมื่อพิจารณาทั้งการผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งจึงเลือกเติมไนโตรเจนที่ระดับ 1.5 กรัมต่อลิตร สำหรับฟอสฟอรัสพบว่า สาหร่ายผลิตชีวมวลและสะสมแป้งสูงที่ระดับฟอสฟอรัส 0.04 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาในสาหร่าย *N. muscorum* TISTR 8871 พบว่า ผลิตชีวมวลและสะสมแป้งสูงที่ระดับไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหาร BG-11 medium เท่ากับ 1.5

กรัมต่อลิตร และ 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (สมรักษ์และคณะ, 2554) ในขณะที่สาหร่าย *Phormedium* sp. เจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลสูงที่ระดับไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหาร BG-11 medium เท่ากับ 6.00 กรัมต่อลิตร และ 0.16 กรัมต่อลิตร (เลิศศักดิ์ และคณะ, 2557)

ระดับความเป็นกรดเบส ผลการทดลองนี้พบว่า *H. welwitschii* TISTR 8237 สามารถผลิตชีวมวลและการสะสมแป้งมีค่าสูงสุดที่ความเป็นกรดเบส 7 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มหรือลดค่าความเป็นกรดเบสจะทำให้สาหร่ายชนิดนี้ผลิตชีวมวลต่ำ เช่นเดียวกับมยุรีและคณะ (2554) พบว่าสาหร่าย *N. muscorum* TISTR 8871 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร N-free BGA ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยให้ผลผลิตชีวมวลเฉลี่ยหลังจากการเพาะเลี้ยง 0.58 ± 0.04 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร คิดเป็น 3.22 เท่าของน้ำหนักแห้งเริ่มต้น ในขณะที่คณิงกานต์ (2547) พบว่า *Synechococcus lividus* strain SKP50 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรดเบส 6.0 แต่อัญชลี (2546) พบว่า *S. lividus* Copeland DSK74 และ *S. bigranulatus* Skuji เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่ระดับความเป็นกรดเบส 11 และ 7 สามารถสร้างไฟโคไซยานินได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับสมถวิล (2531) พบว่าสาหร่ายสกุล *Nostoc* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับความเป็นกรดเบส 7-7.9

3. การผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย anaerobic bacteria

การหมักชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย anaerobic bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 และ *L. amylovorus* TISTR 1110 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic ผลการทดลองพบว่า *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ (Malic acid Lactic acid Acetic acid และ Citric acid) สูงกว่า *L. amylovorus* TISTR 1110 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย anaerobic bacteria เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic

Anaerobic bacteria strains	Organic acids (mM)			
	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid
<i>L. brevis</i> subsp. <i>brevis</i> TISTR 868	447.82±8.02 ^b	604.67±20.48 ^b	1,189.14±37.37 ^b	3,241±136.72 ^b
<i>L. amylovorus</i> TISTR 1110	101.83±8.34 ^a	0.00±0.00 ^a	507.42±21.57 ^a	93.90±1.40 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 เมื่อทำให้เข้มข้น 10 เท่า มีค่าเท่ากับ 9.87 ± 0.18 gDW/L จากนั้นนำมาหมักด้วย anaerobic bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 และ *L. amylovorus* TISTR 1110 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic ผลการทดลองพบว่า การย่อยสลาย (Hydrolysis) ชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 สูงกว่า *L. amylovorus* TISTR 1110 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) โดย *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 และ *L. amylovorus* TISTR 1110 สามารถย่อยชีวมวลสาหร่ายเท่ากับ 78.72 ± 0.70 และ 63.32 ± 0.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การย่อยสลายแป้ง พบว่า *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 สูงกว่า *L. amylovorus* TISTR 1110 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) โดย *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 และ *L. amylovorus* TISTR 1110 สามารถย่อยแป้งเท่ากับ 65.95 ± 1.95 และ 50.10 ± 3.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ชีวมวลสาหร่าย การสะสมแป้ง และการย่อยชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 หลังจากหมักด้วย anaerobic bacteria เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic

Bacterial Strains	Algal biomass (Mean±SE; gDW/L)			% Starch (Mean±SE)		
	Concentrate (10 fold)	After fermented 48 h	Hydrolysis of algal biomass (%)	Concentrate (10 fold)	After fermented 48 h	Hydrolysis of starch (%)
<i>L. brevis</i> subsp. <i>brevis</i> TISTR 868	9.87±0.18 ^a	2.10±0.12 ^a	78.72±0.70 ^b	40.32±0.49 ^a	13.73±0.80 ^a	65.95±1.95 ^b
<i>L. amylovorus</i> TISTR 1110	9.87±0.18 ^a	3.62±0.51 ^b	63.32±0.53 ^a	40.32±0.49 ^a	20.12±1.23 ^b	50.10±3.02 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

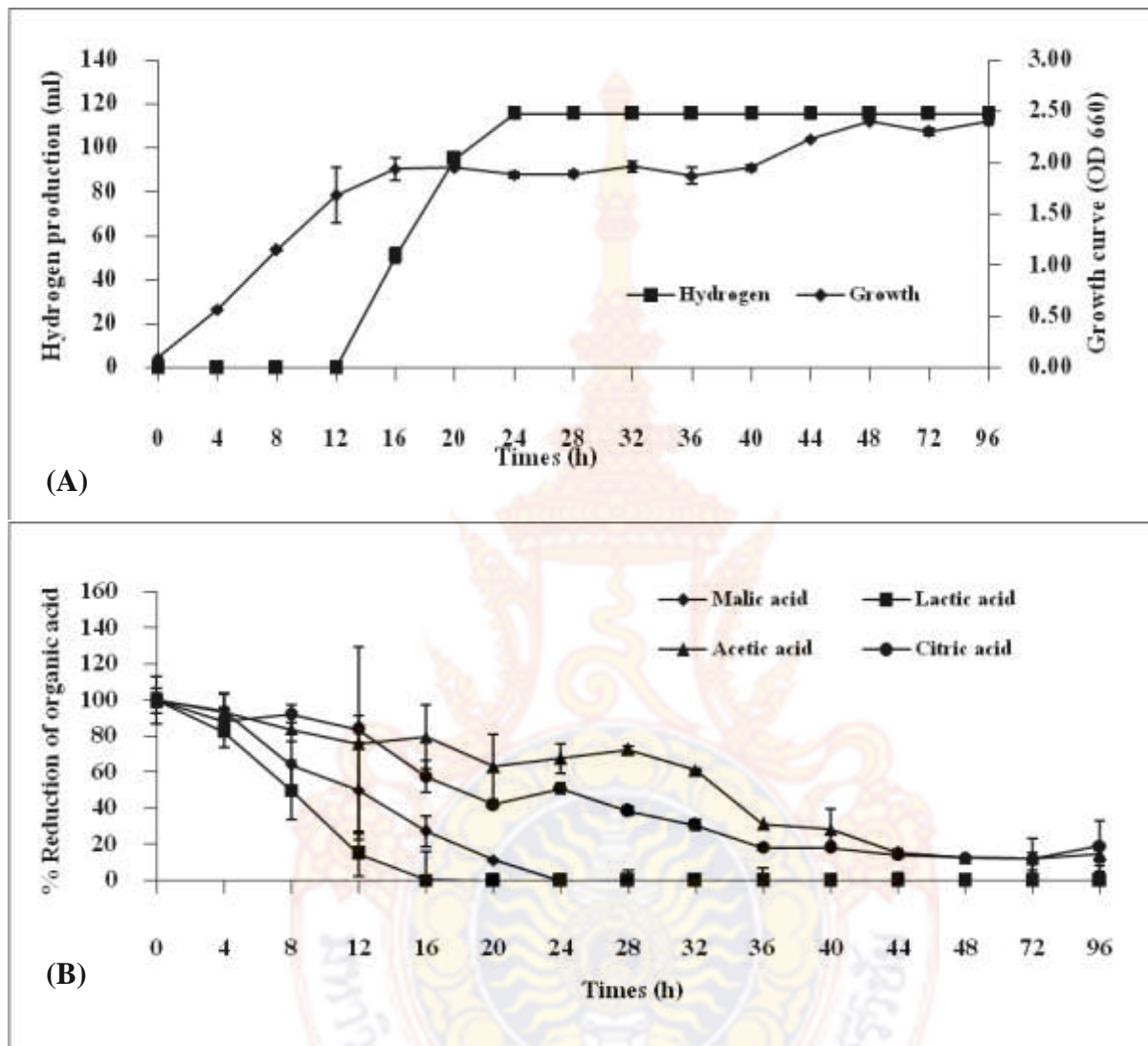
ชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 เมื่อทำให้เข้มข้น 10 เท่า จากนั้นนำมาหมักด้วย anaerobic bacteria ชนิด *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge 10,000g เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน supernatant ออกจากกากสาหร่าย นำ supernatant มาเลี้ยง photosynthesis bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 และ *R. spheriodes* TISTR 1529 ใน bioreactor ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในสภาพ anaerobic ที่อุณหภูมิ 40°C ให้แสง 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ด้วยหลอดไฟ halogen lamps

4.1 การผลิตผลิตไฮโดรเจนด้วย *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953

การเจริญเติบโตของ *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 ใน supernatant พบว่า *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 สามารถเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 8 12 ถึง 16 จากนั้นการเจริญเติบโตจะคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 40 และเพิ่มการเจริญเติบโตอีกครั้งที่ 44 และ 48 จากนั้นจะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมง 96 (ภาพที่ 6A) โดย *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 เริ่มผลิตไฮโดรเจนหลังจากชั่วโมงที่ 12 จากนั้นจะผลิตไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 จะหยุดการผลิตไฮโดรเจนซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง ในอัตราการผลิต 12.45±0.41 mL/hr (ภาพที่ 6A)

การใช้กรดอินทรีย์ พบว่า *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953 สามารถนำกรดอินทรีย์มาใช้ทุกชนิด โดย Lactic acid และ Malic acid จะถูกใช้อย่างรวดเร็วและจะหมดลงในชั่วโมงที่ 16 และ 24

ตามลำดับ ในขณะที่ Citric acid และ Acetic acid จะถูกใช้อย่างรวดเร็วเช่นกันและจะคงที่ในช่วงโม่งที่ 36 และ 44 ตามลำดับ (ภาพที่ 6A)



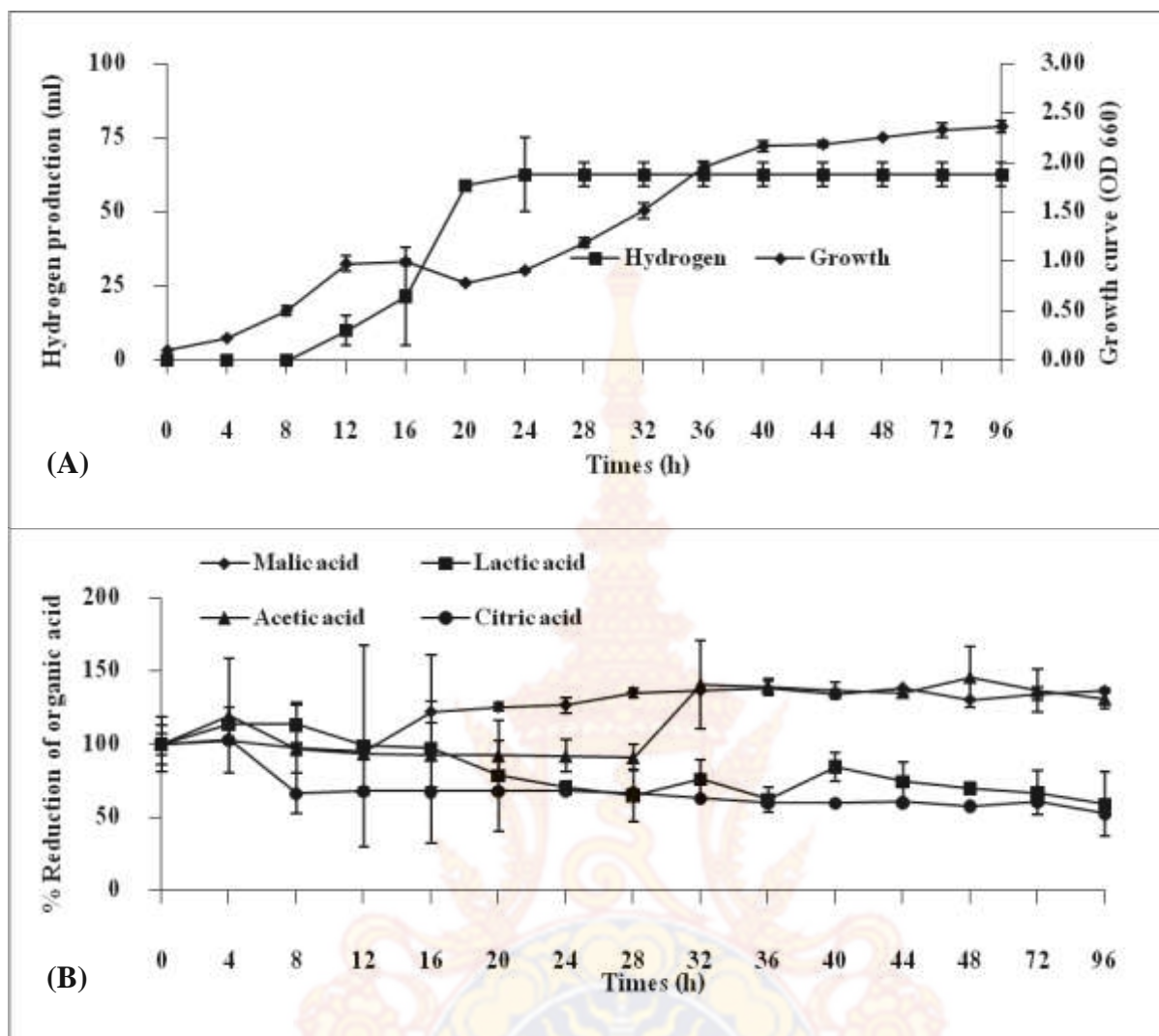
ภาพที่ 6 การผลิตไฮโดรเจน (A) และการใช้กรดอินทรีย์ (B) จาก supernatant ของชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas* sp. TISTR 1953.

4.2 การผลิตผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจนด้วย *R. spheroides* TISTR 1529

การเจริญเติบโตของ *R. spheroides* TISTR 1529 ใน supernatant พบว่า *R. spheroides* TISTR 1529 สามารถเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ถึง 8 จากนั้นการเจริญเติบโตจะคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มการเจริญเติบโตอีกครั้งที่ 28 ถึง 40 จากนั้นจะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมง 96 (ภาพที่ 7A) โดย *R. spheroides* TISTR 1529 เริ่มผลิตไฮโดรเจนหลังจากชั่วโมงที่ 12 จากนั้นจะผลิตไปเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 จะหยุดการผลิตไฮโดรเจนซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง ในอัตราการผลิต 6.25 ± 0.34 mL/hr (ภาพที่ 7A)

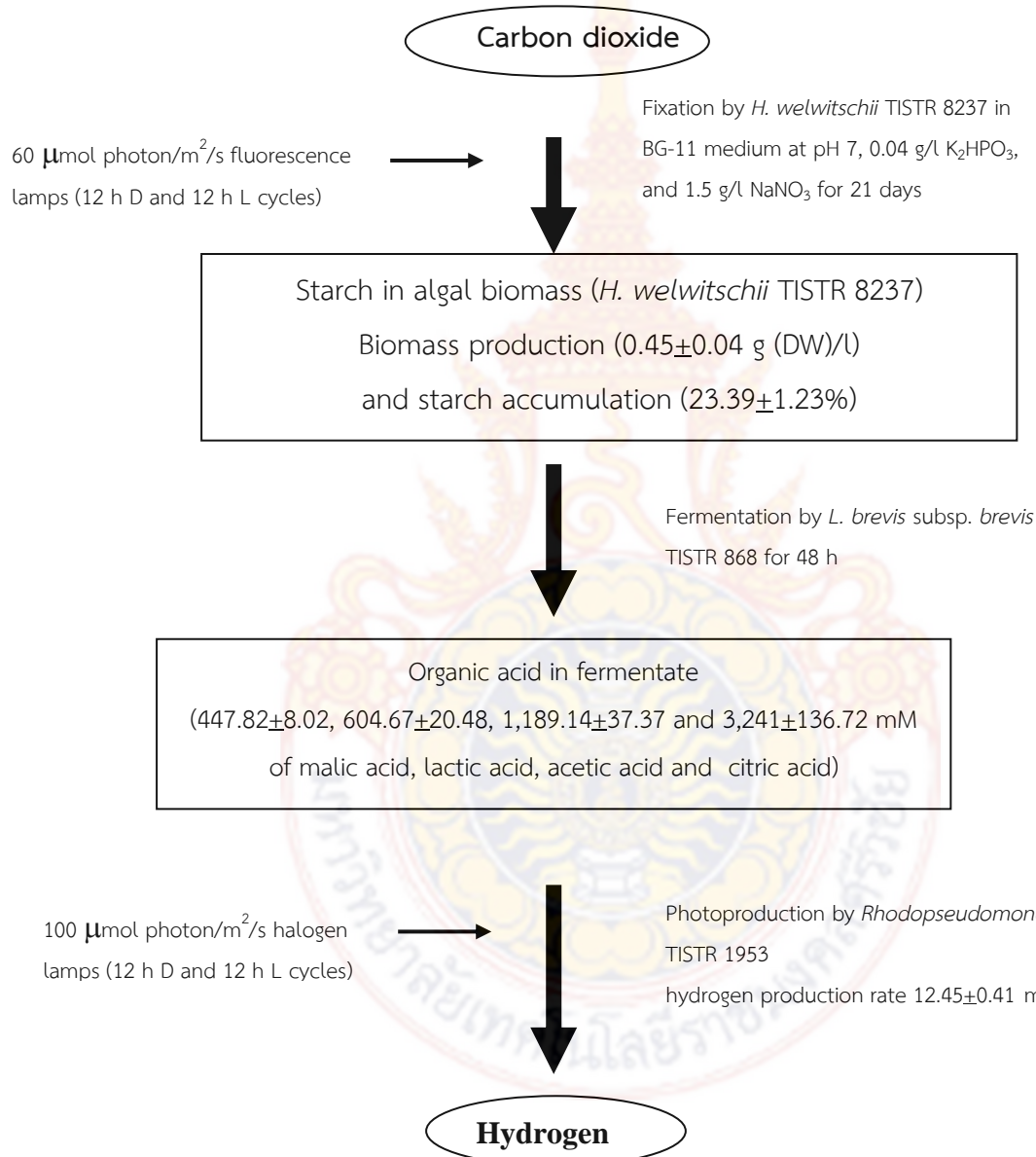
การใช้กรดอินทรีย์ พบว่า *R. spheroides* TISTR 1529 สามารถนำกรดอินทรีย์มาใช้ทุกชนิด โดย Citric acid และ Lactic acid จะถูกใช้อย่างรวดเร็วและจะคงที่ในชั่วโมงที่ 8 และ 24 ตามลำดับ ในขณะที่ Malic acid และ Acetic acid *R. spheroides* TISTR 1529 ไม่สามารถนำไปใช้ได้ยังคงมีปริมาณคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 7A)





ภาพที่ 7 การผลิตไฮโดรเจน (A) และการใช้กรดอินทรีย์ (B) จาก supernatant ของชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย photosynthetic bacteria, *R. spheriodes* TISTR 1529

สรุปจากการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย photosynthesis bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *Rhodopseudomonas* sp. TISTR 1953 และ *R. spheriodes* TISTR 1529 พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. TISTR 1953 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *R. spheriodes* TISTR 1529 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.45 ± 0.41 และ 6.25 ± 0.34 mL/V/hr ตามลำดับ สามารถสรุปขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

สรุป

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ที่สามารถผลิตแป้งสูง

จากการเลี้ยงสาหร่าย *Hapalosiphon* จำนวน 5 ชนิด คือ *H. delicatus* TISTR 8224 *H. fontinalis* TISTR 8225 *H. flagelliformis* TISTR 8234 *Hapalosiphon* sp. TISTR 8236 และ *H. welwitschii* TISTR 8237 เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสงประมาณ $60 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ช่วงแสงมีด:สว่าง เท่ากับ 12:12 ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ โดยเลี้ยงบน shaker ที่ความเร็ว 150 rpm เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองพบว่า *H. welwitschii* TISTR 8237 ผลิตชีวมวลและสามารถสะสมแป้งสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.49 ± 0.06 g DW/l และ 24.05 ± 0.29 % ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชนิด ($p < 0.05$)

2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตการผลิตชีวมวลและการผลิตแป้งของสาหร่าย

Hapalosiphon sp.

การศึกษากการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วยอาหาร 4 สูตร ได้แก่ BG-11 medium, BGA medium, Bold's Basal medium และ Chu medium พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลได้สูงสุดในอาหารสูตร BG-11 medium ระดับความเข้มข้นไนโตรเจน 1.5 g/l NaNO_3 ระดับความเข้มข้นฟอสฟอรัส 0.04 g/l K_2HPO_3 ที่ pH 7 เป็นระยะเวลา 21 วัน

3. การผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. ด้วย anaerobic bacteria

การหมักชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย anaerobic bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 และ *L. amylovorus* TISTR 1110 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic ผลการทดลองพบว่า *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 สามารถผลิตกรดอินทรีย์สูงสุด ซึ่งมีค่า Malic acid Lactic acid Acetic acid และ Citric acid เท่ากับ 447.82 ± 8.02 , 604.67 ± 20.48 , $1,189.14 \pm 37.37$ and $3,241 \pm 136.72$ mM และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การย่อยสลาย (Hydrolysis) ชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 และการย่อยสลายแป้งพบว่า *L. brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 มีค่าสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 78.72 ± 0.70 และ 65.95 ± 1.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *Hapalosiphon* sp. โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system

ผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ด้วย photosynthesis bacteria จำนวน 2 ชนิด คือ *Rhodopseudomonas* sp. TISTR 1953 และ *R. spheriodes* TISTR 1529 พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. TISTR 1953 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *R. spheriodes* TISTR 1529 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.45 ± 0.41 และ 6.25 ± 0.34 mL/hr ตามลำดับ



เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา. 2547. ก๊าซไฮโดรเจน แหล่งพลังงานทดแทนที่ไม่มีวันสูญสิ้น. ที่มา: <http://www.vcharkarn.com/include/article/showarticle.php?Aid=163>, 29 พฤษภาคม 2547.
- คณิงกานต์ กลั่นบุศย์. 2547. เอนไซม์ไฟเตสจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มยุรี ตังธนานุวัฒน์, นาริสรา วงศ์สิงห์ และอาภารัตน์ มหาจันทร์. 2554. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Nostoc muscorum* TISTR 8871 ในระดับห้องปฏิบัติการ. ใน: การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- เลอศักดิ์ ธนบัตร, ธรรมวุธ วรวงศ์เวทย์ มาโนช ขำเจริญ และ สมรักษ์ รอดเจริญ. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Phormedium* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ. ใน: การสัมมนาวิชาการวิทยาศาสตร์การประมง ระดับปริญญาตรี ครั้งที่ 9, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.
- สุพรรณษา ชันธโสภา, อรรถพล มะตนะเด, ศุภชัย ฤกษ์เกษม กัญญ์ กังวานสายชล และอาภารัตน์ มหาจันทร์. 2554. การวิจัยและพัฒนาการผลิตพลังงานที่ยั่งยืนของสาหร่ายขนาดเล็กในคลังเก็บสาหร่ายรว. ใน: การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, หน้า 131, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ. 2542. พลังงานทางเลือกการใช้เชื้อเพลิงของประเทศ ไทย. 24 หน้า. กรุงเทพฯ
- สมรักษ์ รอดเจริญ, นิรันดร์ จันทวงศ์, อาภารัตน์ มหาจันทร์ และคาซุฮิสะ มียาโมโตะ. 2554. การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่าย *Nostoc muscorum* TISTR 8871 โดยวิธี three-step microbial. ใน: การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สมถวิล วัลลิสุด. 2531. การศึกษาการแพร่กระจายและคัดเลือกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ติ่งไนโตรเจน
ได้เพื่อนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สบสุข ลีละบุตร. 2544. ไฮโดรเจนเชื้อเพลิงสำหรับอนาคต. วารสารประสิทธิภาพพลังงาน. 60:15-19.

อัญชลี เชื้อนเพชร. 2546. ผลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงบางประการต่อการผลิตไฟโคไซยานินจากสาหร่าย
สีเขียวแกมน้ำเงินทนร้อน *Synechococcus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Abrahamssona, K., K. Choob, M. Pedersénb, G. Johanssonc and P. Snoeijjs. 2003. Effects of
temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by
brackish-water algae. *Phytochem.* 64(3): 725-734 .

Amos, W.A. 2003. Updated cost analysis of photobiological hydrogen production from
Chlamydomonas reinhardtii green algae. 28 p. Milestone report for the U.S.
department of energy's HCFIT Program Analysis Task.

Asada, Y. and J. Miyake. 1999. Review photobiological hydrogen production. *J Biosci Bioeng*
88(1) 1-6.

Akkerman, I., M. Janssen, J. Rocha and R.H. Wijffels. 2002. Photobiological hydrogen
production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy*
27:1195-1208.

Benemann, J.R. and N.M. Weare. 1974. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabbaena*
cylindrica culture. *Science.* 184:174-175.

Cournac, L., F. Mus, L. Bernard, G. Guedeney, P. Vignais and G. Peltier. 2002. Limiting steps of
hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as
analysed by light-induced gas exchange transients. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1229-
1237.

- Gaffon, H. 1939. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae. **Am J Bot** 27:273-283 .
- Gaffon, H. and J. Rubin. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **J Gen Physiol** 26:219-240.
- Gartner, J. 2004. **Algae: Power plant of the future?** Available Source: <http://www.wired.com/new/technology/0,1282,54456,00.html>, May 6, 2004.
- Guan, Y., M. Deng, X. Yu and W. Zhang. 2004. Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. **Biochem Eng J** 19:69-73.
- Ike, A., N. Toda, K. Hirata and K. Miyamoto. 1997a. Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: Application of lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylovorus*. **J. Ferment. Bioeng.** 84(5):428-433.
- Ike, A., N. Toda, N. Tsuji, K. Hirata and K. Miyamoto. 1997b. Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: Application of halotolerant bacterial community. **J. Ferment. Bioeng.** 84(6):606-609.
- Ike, A., T. Murakawa, H. Kawaguchi, K. Hirata and K. Miyamoto. 1999. Photoproduction of hydrogen from raw starch using a halophilic bacterial community. **J Biosci Bioeng** 88(1): 72-77.
- Kawaguchi, H., K. Hashimoto, K. Hirata and K. Miyamoto. 2001. H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. **J. Ferment. Bioeng.** 91(3):277-282.
- Kim, M.S., J.S. Baek, Y.S. Yun, S.J. Sim, S. Park and S.C. Kim. 2006. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. **Int. J. Hydrogen Energ.** 31:812-816.

- Kochart, AG. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method, In **Handbook of phycological and biochemical methods**, edited by Hellebust, J.A. and Craigie, J.S. Cambridge Univ. Press Publ., pp. 95-97.
- Laurinavichene, T.V., I.V. Tolstygina, R.R. Galiulina. M.L. Ghirardi, M. Seibert and A.A. Tsygankov. 2002. Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction. **Int J Hydrogen Energy** 27:1245-1249.
- Masukawa, H., M. Mochimaru and H. Sakurai. 2002. Hydrogenases and photobiological hydrogen production utilization nitrogenase system in cyanobacteria. **Int J Hydrogen Energy** 27:1471-1474.
- Mertens R. and A. Liese. 2004. Biotechnological applications of hydrogenases. **Current Opinion in Biotechnology**. 15: 343-348.
- Miyake, J., M. Miyake and Y. Asada. 1999. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. **J Biotech** 70: 89-101.
- Miyamoto, K. 1994. Hydrogen production by photosynthetic bacteria and microalgae. 771-785. In Y. Murooka and T. Imanaka, eds. **Recombinant microbes for industrial and agricultural applications**. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Miyomoto, K. 1997. **Renewable biological systems for alternative sustainable energy production**. 110 p. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Rodjaroen, S. 2010. **Photobiological Hydrogen Production from Native Green Algal Strains and Cyanobacterial Strains of Thailand**. Thesis of Ph D. Kasetsart University. 176 p.
- Tsygankov, A., S. Kosourov, M. Seibert and M.L. Ghirardi. 2002. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. **Int J Hydrogen Energy** 27:1239-1244.

Weissman, J.C. and J.R. Benemann. 1977. Hydrogen production by nitrogen-starved cultures *Anabaena cylindrica*. **Appl environ Microbiol.** 33(1): 123-131.

Wunschiers, R. and P. Lindblad. 2002. Hydrogen in education – a biological approach. **Int J Hydrogen Energy** 27:1131-1140.

Yildiz, F.H., J.P. Davies and A.R. Grossman. 1994. Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient grow. **Plant Physiol** 104:981-987.



ภาคผนวก

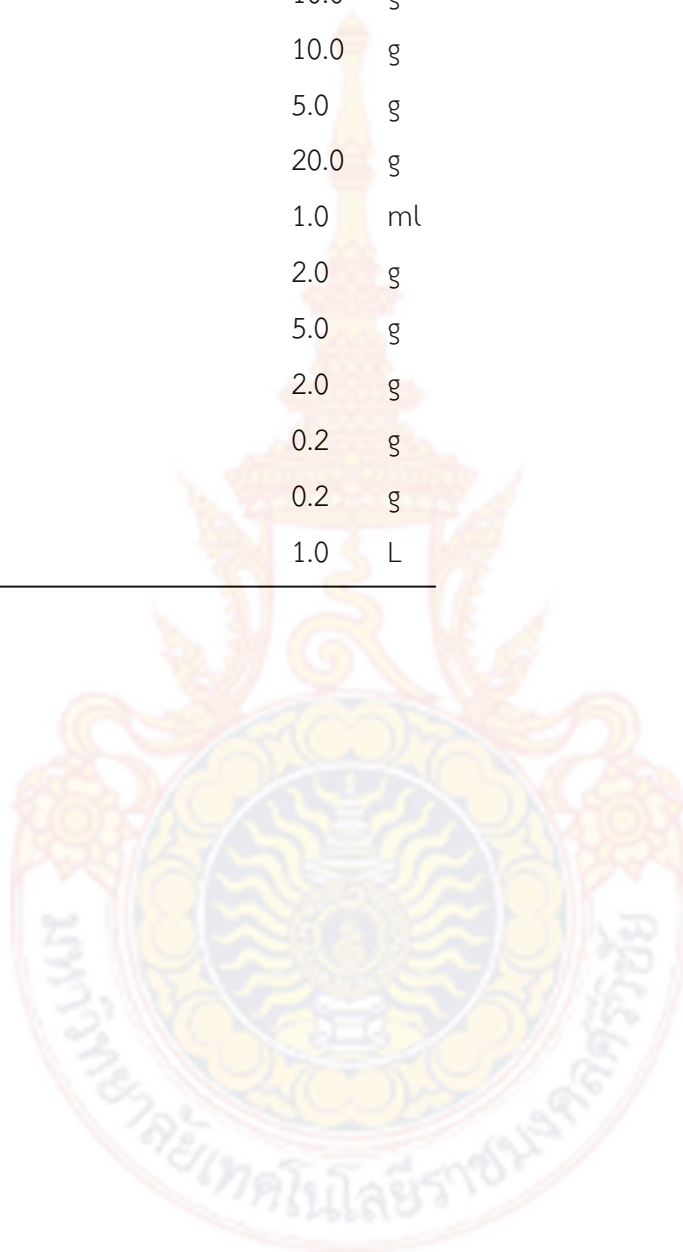


ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและสาหร่าย



ตารางภาคผนวก ก.1 MRS medium (de Man, Rogosa and Sharpe) (ATCC, 1989)

Nutrient	Quantity
Peptone	10.0 g
Beef Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Glucose	20.0 g
Tween 80	1.0 ml
K ₂ HPO ₄	2.0 g
Sodium acetate	5.0 g
Tri-ammonium citrate	2.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2 g
Distilled water to	1.0 L



ตารางภาคผนวก ก.2 Yeast agar medium (ATCC, 1989)

Nutrient	Quantity
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.5 g
Yeast Extract	10.0 g
Agar	20.0 g
Tap water to	1.0 L
Adjust pH to 7.0-7.2	



ตารางภาคผนวก ก.3 CHU medium (Chu, 1942)

Nutrient	Quantity
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.04 mg
K_2HPO_4	0.01 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg
Na_2CO_3	0.02 mg
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg
FeCl_3	0.8 mg
Distilled water to	1.0 L



ตารางภาคผนวก ก.4 Bold's Basal Medium (Stein, 1973)

Nutrient	Quantity
Macronutrient	
NaNO ₃	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g
NaCl	1 g
K ₂ HPO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	7 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g
Trace element	
EDTA stock	
EDTANa ₂	5.0 g
KOH	3.1 g
Distilled water to	100 ml
H-Fe stock	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98 g
conc H ₂ SO ₄	1.0 ml
Distilled water to	1.0 L
Boron stock	
H ₃ BO ₃	1.0 ml
Distilled water to	1.0 L
H-H5 stock	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49 g
Distilled water to	1.0 L

ตารางภาคผนวก ก.5 BG-11 medium (Steiner *et al.*, 1974)

Nutrient	Quantity
NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40.0 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	75.0 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	36.0 mg
Citric acid	6.0 mg
Ferric ammonium Citrate	6.0 mg
EDTA (disodium magnesium)	1.0 mg
Na ₂ CO ₃	20.0 mg
Trace metal mix A5 + Co*	1.0 ml
Distilled water to	1.0 L
pH after autoclaving and cooling : 7.4	
* TRACE METAL MIX A5 + Co	
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	20.0 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	390.0 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	79.0 mg
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	49.0 mg
Distilled water to	1.0 L

ตารางภาคผนวก ก.6 BGA medium (Antarikanonda *et al.*, 1980)

Nutrient	Quantity
NaCl	70.0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	380.0 mg
CaCl ₂	80.0 mg
K ₂ HPO ₄	600.0 mg
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·6H ₂ O	10.0 mg
Titriplex III	27.0 mg
H ₃ BO ₃	3.0 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.0 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	8.0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08 mg
CoCl ₂	0.02 mg
Distilled water to	1.0 L

pH after autoclaving and cooling : 7.5





ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ข.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *Hapalosiphon*

5 ชนิด

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.160	4	.040	19.789	.000
	Within Groups	.020	10	.002		
	Total	.181	14			
STARCH	Between Groups	141.257	4	35.314	136.556	.000
	Within Groups	2.586	10	.259		
	Total	143.843	14			

ตารางภาคผนวก ข.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *Hapalosiphon* 5 ชนิด

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
8224.00	3	.1867	
8236.00	3	.2400	
8234.00	3	.2567	
8225.00	3	.2667	
8237.00	3		.4867

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ข.3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *Hapalosiphon* 5 ชนิด

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
8234.00	3	15.3033		
8224.00	3	16.3133		
8236.00	3		19.0100	
8225.00	3		19.8433	
8237.00	3			24.0533

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางภาคผนวก ข.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระยะเวลาต่างกัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.175	4	.044	7.394	.005
	Within Groups	.059	10	.006		
	Total	.234	14			
STARCH	Between Groups	66.104	4	16.526	8.261	.003
	Within Groups	20.004	10	2.000		
	Total	86.108	14			

ตารางภาคผนวก ข.5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระยะเวลาต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
7.00	3	.3100		
14.00	3	.4033	.4033	
21.00	3	.4767	.4767	.4767
28.00	3		.5633	.5633
35.00	3			.6100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ข.6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระยะเวลาต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
7.00	3	22.7300		
14.00	3	23.6467	23.6467	
21.00	3		26.2533	26.2533
35.00	3			27.7700
28.00	3			27.8033

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางภาคผนวก ข.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.050	3	.017	8.940	.006
	Within Groups	.015	8	.002		
	Total	.065	11			
STARCH	Between Groups	195.609	3	65.203	16.260	.001
	Within Groups	32.080	8	4.010		
	Total	227.690	11			

ตารางภาคผนวก ข.8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3.00	3	.2867	
1.00	3	.3000	
2.00	3	.3633	.3633
4.00	3		.4500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ข.9 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	3	12.6400		
2.00	3	16.8667	16.8667	
3.00	3		20.5933	20.5933
4.00	3			23.3867

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางภาคผนวก ข.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับไนโตรเจนต่างกัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.164	6	.027	8.391	.001
	Within Groups	.046	14	.003		
	Total	.210	20			
STARCH	Between Groups	393.102	6	65.517	13.578	.000
	Within Groups	67.553	14	4.825		
	Total	460.655	20			

ตารางภาคผนวก ข.11 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับไนโตรเจนต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
1.00	3	.2505			
7.00	3	.3100	.3100		
5.00	3	.3108	.3108		
2.00	3	.3537	.3537	.3537	
14.00	3		.4033	.4033	.4033
4.00	3			.4807	.4807
3.00	3				.5107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ข.12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับไนโตรเจนต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4.00	3	14.3000	
5.00	3	15.6067	
2.00	3	16.9000	
7.00	3		22.7300
14.00	3		23.6467
3.00	3		24.9033
1.00	3		25.1300

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางภาคผนวก ข.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับฟอสฟอรัสต่างกัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.089	6	.015	7.611	.001
	Within Groups	.027	14	.002		
	Total	.116	20			
STARCH	Between Groups	412.175	6	68.696	48.087	.000
	Within Groups	20.000	14	1.429		
	Total	432.175	20			

ตารางภาคผนวก ข.14 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับฟอสฟอรัสต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	3	.3100	
7.00	3	.3100	
14.00	3	.4033	.4033
2.00	3	.4167	.4167
5.00	3		.4500
3.00	3		.4700
4.00	3		.4767

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวก ข.15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับฟอสฟอรัสต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
1.00	3	12.1067			
5.00	3	14.1267	14.1267		
4.00	3		16.4033	16.4033	
2.00	3			19.0067	
7.00	3				22.7300
14.00	3				23.6467
3.00	3				23.9033

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางภาคผนวก ข.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนชีวมวลและการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับ pH ต่างกัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BIOMASS	Between Groups	.039	3	.013	45.683	.000
	Within Groups	.002	8	.000		
	Total	.041	11			
STARCH	Between Groups	83.118	3	27.706	22.799	.000
	Within Groups	9.722	8	1.215		
	Total	92.840	11			

ตารางภาคผนวก ข.17 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชีวมวลของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับ pH ต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
9.00	3	.3718		
8.00	3	.4020	.4020	
6.00	3		.4223	
7.00	3			.5237

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

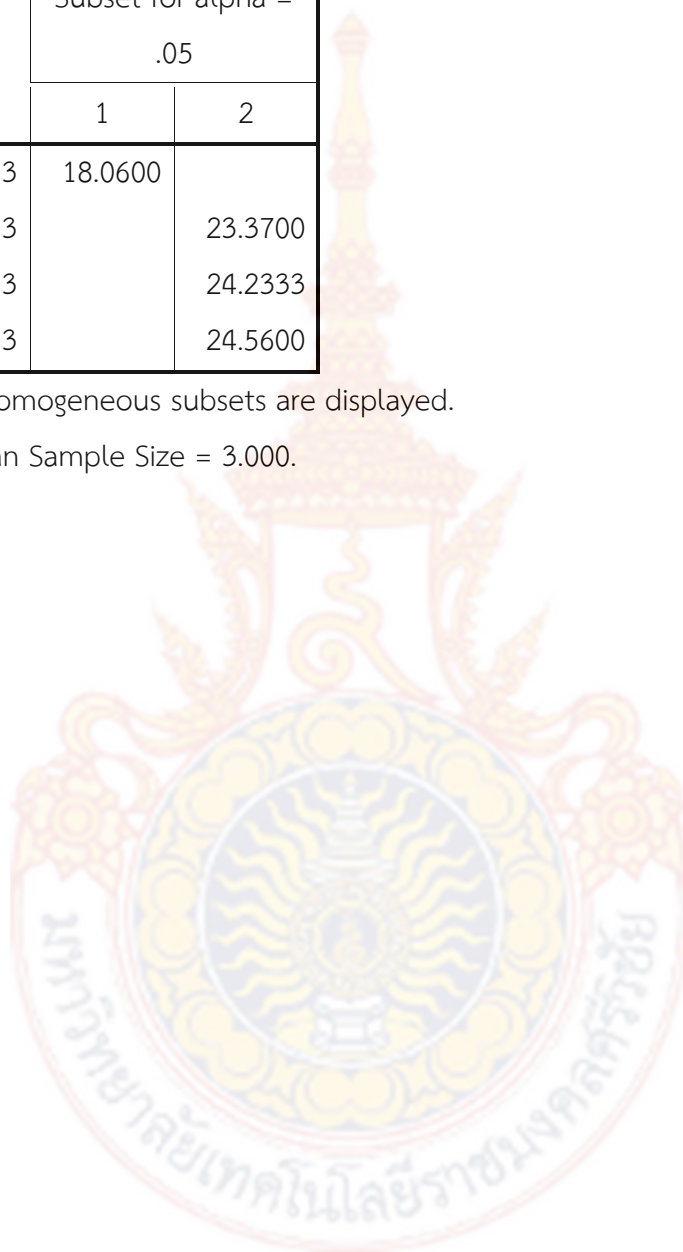
ตารางภาคผนวก ข.18 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการสะสมแป้งของสาหร่าย *H. welwitschii* TISTR 8237 ที่เลี้ยงในระดับ pH ต่างกัน

Tukey B

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
6.00	3	18.0600	
8.00	3		23.3700
7.00	3		24.2333
9.00	3		24.5600

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ภาคผนวก ค

ภาพแสดงการเลี้ยงสาหร่าย การผลิตกรดอินทรีย์ และการผลิตไฮโดรเจน





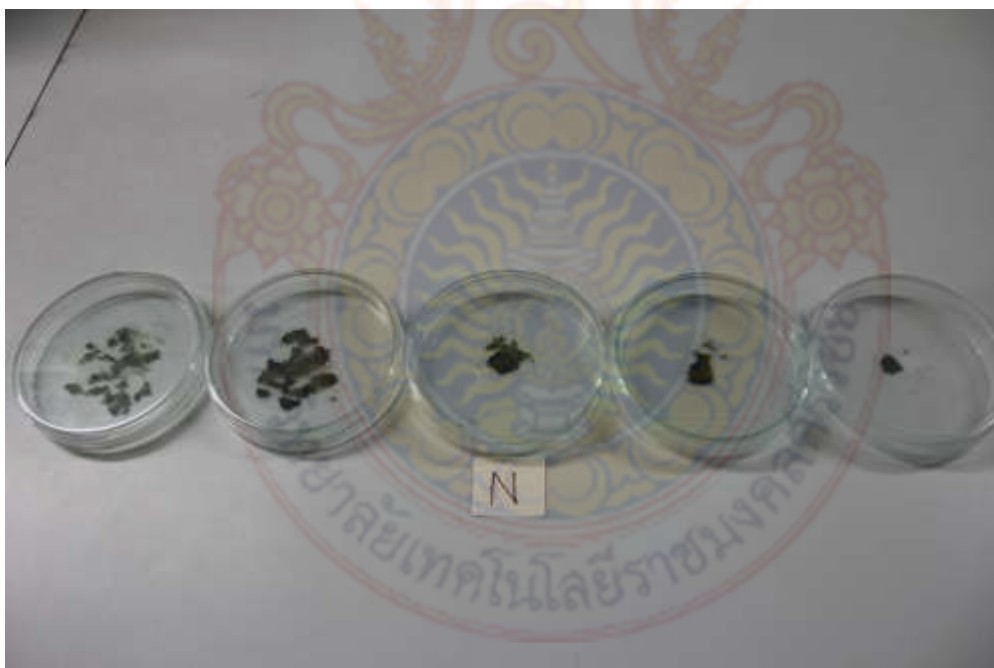
ภาพภาคผนวกที่ ค.1 สำหรับ *H. welwitschii* TISTR 8237



ภาพภาคผนวกที่ ค.2 สำหรับ *H. flagelliformis* TISTR 8234



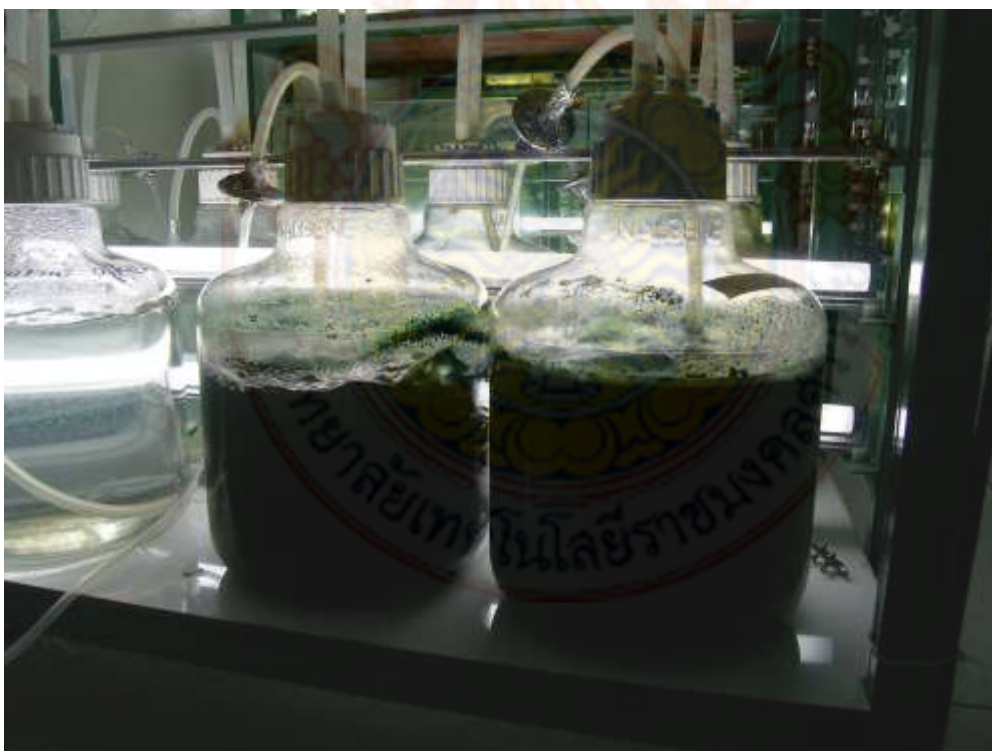
ภาพภาคผนวกที่ ค.3 การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม



ภาพภาคผนวกที่ ค.4 การหาน้ำหนักสาหร่าย



ภาพภาคผนวกที่ ค.5 การเลี้ยงสาหร่ายในขวดชมภู



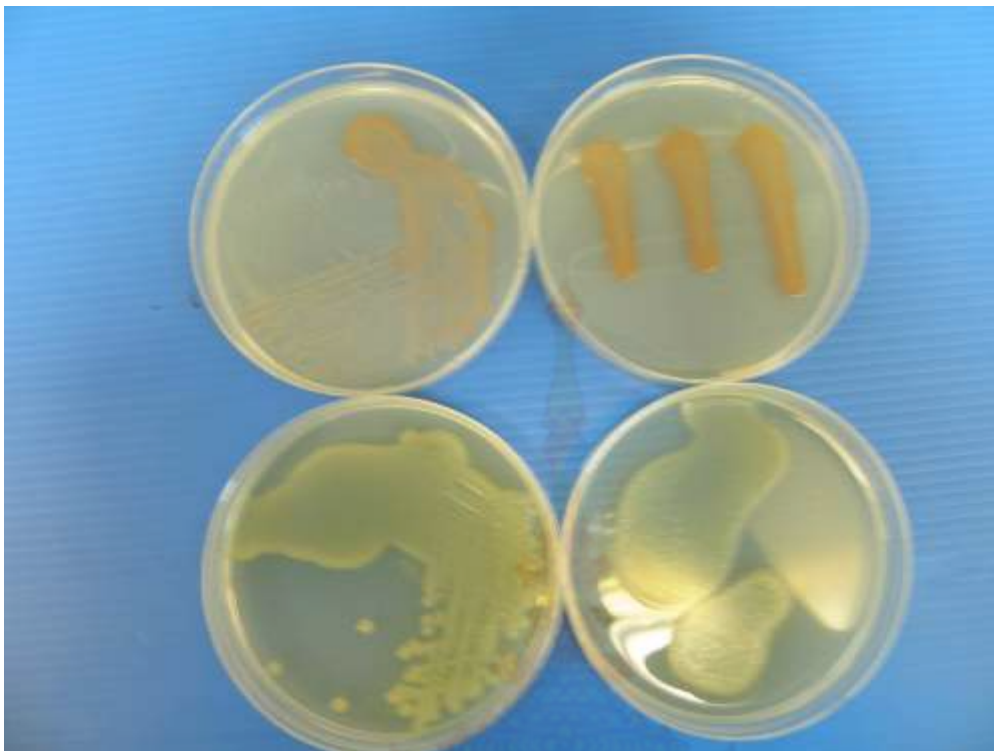
ภาพภาคผนวกที่ ค.6 การเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 10 ลิตร



ภาพภาคผนวกที่ ค.7 การหมักชีวมวลสาหร่ายด้วยแบคทีเรียไร้อากาศ



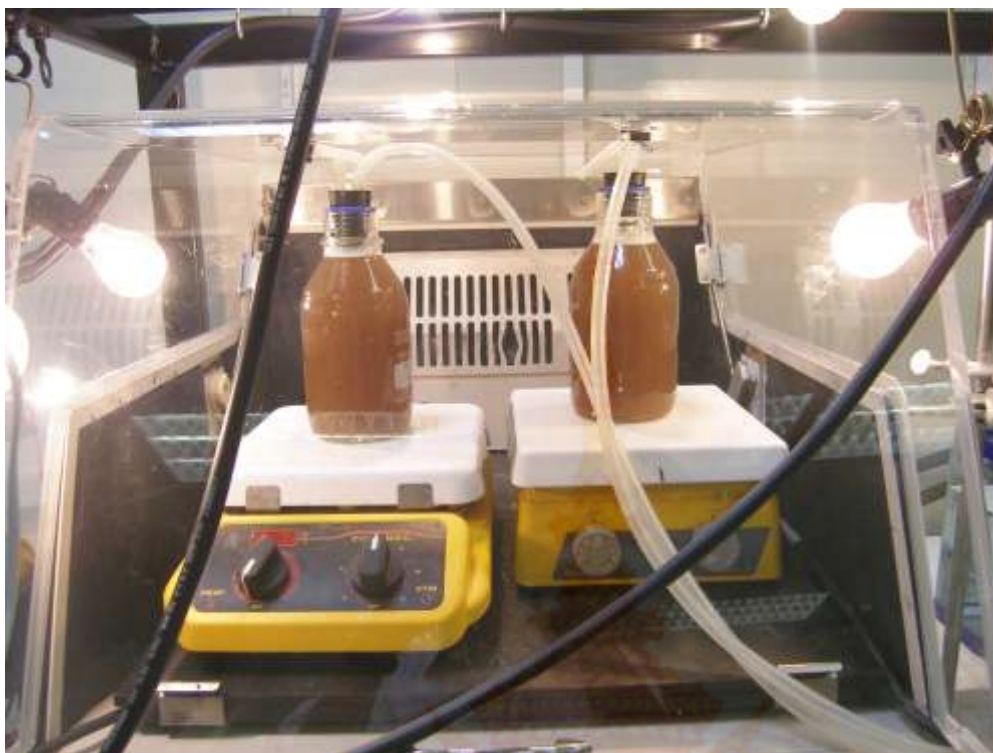
ภาพภาคผนวกที่ ค.8 Supernatant



ภาพภาคผนวกที่ ค.9 เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่เลี้ยงในอาหารแข็ง



ภาพภาคผนวกที่ ค.10 เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่เลี้ยงในอาหารเหลว



ภาพภาคผนวกที่ ค.11 การผลิตไฮโดรเจน



ภาพภาคผนวกที่ ค.12 การวัดปริมาตรไฮโดรเจนด้วยการแทนที่น้ำ